

Aus dem Institut für Pathologie, Abteilung für Neuropathologie

Direktor: Prof. Dr. med. A. Pagenstecher



des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg in Zusammenarbeit mit
dem Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH, Standort Marburg

Einfluss von TIMP-3 auf den Verlauf der experimentellen allergischen Enzephalomyelitis

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades der gesamten

Humanmedizin

dem Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

Bartosz Bujan

aus Częstochowa (Polen)

Marburg, 2013

Angenommen vom Fachbereich Medizin der Philipps-Universität Marburg

am: 06.06.2013.

Gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches

Dekan: Prof. Dr. Matthias Rothmund

Referent: Prof. Dr. Axel Pagenstecher

Korreferent: Prof. Dr. Michael Lohoff

Inhaltsverzeichnis	Seite
1. Zusammenfassung (Deutsch/Englisch)	7
2. Einleitung	9
2.1 Multiple Sklerose (MS)	9
2.2 Experimentelle allergische Enzephalomyelitis (EAE)	10
2.3 Metalloproteinasen und ihre Inhibitoren	12
2.3.1 Matrix-Metalloproteinasen (MMPs): Struktur und Funktionen	12
2.3.2 A Disintegrin and Metalloproteinasen (ADAMs)	13
2.4 Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinasen (TIMPs)	14
2.4.1 Struktur und Molekularbiologie von TIMP-3	15
2.4.2 Funktionen des TIMP-3	15
2.4.3 TIMP-3 bei physiologischen und pathologischen Prozessen im ZNS	16
2.5 Zielsetzungen der Arbeit	17
3. Material und Methoden	18
3.1 Material	18
3.1.1 Chemikalien, Verbrauchsmaterialien	18
3.1.2 Allgemeine Puffer, Lösungen	19
3.1.3 Antikörper	21
3.1.4 Geräte	23
3.2 Methoden	24
3.2.1 Passive Induktion der experimentellen allergischen Enzephalomyelitis	24
3.2.2 Aktive Induktion der experimentellen allergischen Enzephalomyelitis	26

3.3 Phänotypische Untersuchungen an TIMP-3 ^{-/-} -Mäusen und Kontrollen	26
3.3.1 Beurteilung der Schweregrade der experimentellen allergischen Enzephalomyelitis	26
3.4 Morphologische und funktionelle Untersuchungen	28
3.4.1 Rückenmark-, Gehirn-, Blut- und Organentnahme, Weiterverarbeitung	28
3.4.1.1 Entnahme von Gehirn, Rückenmark und Organen	28
3.4.1.2 Blutentnahme und Serumisolierung	28
3.4.2 Anfertigung von histologischen Schnitten	28
3.4.3 Histochemie	29
3.4.4 Immunhistochemie (IHC) und Immunfluoreszenz	30
3.5 Proliferationsassay von oligodendroglialen Progenitoren	31
3.5.1 Intraperitoneale Applikation von 5-Bromo-2'deoxyuridin (BrdU)	31
3.5.2 Quantitative Analyse von proliferierenden oligodendroglialen Progenitoren	31
3.6 Methoden zur Arbeit mit DNA	32
3.6.1 DNA-Isolierung	32
3.6.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	32
3.6.3 DNA-Gelelektrophorese	34
3.7 Methoden zur Arbeit mit RNA	34
3.7.1 Extraktion und Quantifizierung von Gesamt-RNA	34
3.7.2 RNase Protection Assay (RPA)	35
3.7.2.1 Herstellung einer RNA-Sonde	36
3.7.2.2 DNase Verdau und RNA Fällung	37
3.7.2.3 Szintillationsmessung und Ansatz der Working Dilution	38
3.7.2.4 Hybridisierung, RNase Behandlung und Proteinase-K Verdau	39

3.7.2.5 Präzipitation der Hybride und Deaktivierung der RNAsen	39
3.7.2.6 Elektrophorese mit Polyacrylamid-Gel und Röntgenfilm-Entwicklung	40
3.8 Methoden zur Arbeit mit Proteinen	40
3.8.1 Proteinextraktion	40
3.8.2 Isolierung von löslichen und membranösen TNF-Formen	41
3.8.3 Enzym-linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)	41
4. Ergebnisse	42
4.1 Etablierung des Mausmodells	42
4.2 Genotypisierung der TIMP3 ^{-/-} -Mäusen	42
4.3 Auswirkungen der TIMP-3-Expression auf den Phänotyp	43
4.3.1 Klinische Evaluation des EAE-Verlaufs	43
4.3.1.1 Klinische Evaluation der passiv induzierten EAE	43
4.3.1.2 Aktiv induzierte EAE – Etablierung des TIMP3 ^{-/-} -Modells	45
4.3.2 Histologische Besonderheiten der inneren Organe	51
4.3.3 Histologische Besonderheiten des Zentralnervensystems	53
4.3.3.1 Histologie des Zentralnervensystems	53
4.3.3.2 Begutachtung des kunststoffeingebetteten Materials aus dem Rückenmark	54
4.3.3.3 Immunhistochemische Färbungen des Zentralnervensystems	55
4.4 Proliferationsassay von oligodendroglialen Progenitoren (BrdU/NG2)	56
4.5 Molekularbiologische Untersuchungen auf mRNA-Ebene	59
4.5.1 TIMP3-Expression auf mRNA-Ebene	59
4.5.2 ADAM-10- und ADAM-17-Expression auf mRNA-Ebene	60
4.5.3 Caspase-3-Expression auf mRNA-Ebene	61
4.6 Analyse der TNF-Expression auf der Proteinebene	63
5. Diskussion	64
5.1 Auswirkungen des TIMP-3 auf den klinischen Verlauf der EAE	64
5.2 TIMP-3-Expression und histomorphologische ZNS-Veränderungen	67

5.3 TIMP-3 ^{-/-} führt zur Aufregulierung von ADAM-10- und ADAM-17-mRNA	68
5.4 „Zwei Gesichter“ von TNF im EAE-Modell	69
5.5 Effiziente Remyelinisierung als Korrelat der klinischen EAE-Remission	70
5.6 Klinische Perspektiven und Weiterführung des Projektes	72
6. Literaturverzeichnis	75
7. Abkürzungenverzeichnis	85
8. Lebenslauf	88
9. Verzeichnis der akademischen Lehrer	89
10. Danksagung	90

1. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Dissertation wurden die Effekte des Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinases (TIMP-3) auf den Verlauf der experimentellen allergischen Enzephalomyelitis (EAE) untersucht, die als ein Tiermodell für die Multiple Sklerose (MS) eingesetzt wird. Das TIMP-3-Protein gilt als ein potenter Inhibitor von Matrix-Metallproteinasen und reguliert neben der Angiogenese die apoptotische Kaskade. Es wurden aktiv und passiv induzierte EAE-Experimente mit TIMP-3-defizienten (TIMP-3^{-/-}) und Wildtyp- (WT-)Mäusen durchgeführt. Im akuten Stadium der EAE konnten klinisch keine signifikanten Unterschiede zwischen den beiden untersuchten Tierlinien nachgewiesen werden. Es zeigte sich eine signifikant gestörte Remission der klinischen Symptome bei TIMP-3^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen (*p≤0,05). Histopathologische Untersuchungen zeigten im späten Stadium der EAE die persistierenden, nahezu komplett demyelinisierten Herde im Rückenmark der TIMP-3^{-/-}-Mäuse. Das Ausmaß der Remyelinisierung wurde mit einem Proliferationsassay für proliferierende oligodendrogliale Vorläuferzellen (Progenitoren) untersucht. Bei TIMP-3^{-/-}-Mäusen ergab sich eine reduzierte intra- und periläsionale Dichte dieser Zellen. Diese spielen eine entscheidende Rolle bei der effizienten Remyelinisierung. Außerdem zeigte sich übereinstimmend mit morphologischen Untersuchungen eine gesteigerte Expression von ADAM-17 und Caspase-3 auf mRNA-Ebene im Rückenmark von TIMP-3^{-/-}-Mäusen. Die TNF-ELISA-Untersuchung von Proteinextrakten aus dem Rückenmark ergab höhere Konzentrationen von löslichem TNF bei TIMP-3^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu WT-Mäusen, welcher über den Tumor Necrosis Factor Receptor 1 (TNFR1) eine oligodendrogliale Apoptose induziert. Parallel wiesen die TIMP-3^{-/-}-Mäuse im Rückenmark geringe Mengen des membranösen TNF auf, der über den Tumor Necrosis Factor Receptor 2 (TNFR2) die Proliferation oligodendroglialer Progenitoren stimuliert. Diese Ergebnisse zeigen, dass TIMP-3 für die Remyelinisierung im Rückenmark bei der EAE wichtig ist. Die fehlende Remission in TIMP-3^{-/-}-Mäusen geht dabei mit einer veränderten TNF Aktivierung einher, die möglicherweise zur gestörten Remyelinisierung mit beiträgt, indem sie die Dichte an oligodendroglialen Vorläuferzellen beeinflusst. Diese Arbeit trägt zu einem besseren Verständnis der Remyelinisierung bei und kann möglicherweise zu neuen therapeutischen Ansätzen für Patienten mit MS führen.

Summary

The aim of this project was to determine the role of the Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinases 3 (TIMP-3) in experimental allergic encephalomyelitis (EAE); a model for the human disease multiple sclerosis (MS). TIMP-3 is a potent inhibitor of matrix metalloproteases and regulates angiogenesis as well as apoptosis. During the acute phase of EAE, the clinical course in either the actively or passively induced disease was comparable to the TIMP-3-deficient (TIMP-3^{-/-}) and wildtype (WT) mice. However, during the late phase of the disease, remission was significantly less pronounced in TIMP-3^{-/-} mice compared with WT mice (*p≤0.05). The histopathological examinations of the spinal cords revealed that demyelinated lesions persisted and were more prominent in TIMP-3^{-/-} mice than in WT mice. In parallel, the spinal cord of TIMP-3^{-/-} mice showed a reduced density of proliferating oligodendroglial precursor cells which are critical for re-myelination. In addition, in the spinal cord of TIMP-3^{-/-} mice the expression of pro-apoptotic ADAM-17 and caspase-3 was increased at the mRNA level when compared with WT mice. The ELISA analysis of TNF from the spinal cord revealed higher levels of soluble TNF in TIMP-3^{-/-} mice compared with WT mice; this promotes through TNFR1 (tumor necrosis factor receptor 1) the apoptosis of the oligodendroglial progenitors. In parallel, reduced levels of membrane-bound TNF have been measured in TIMP-3^{-/-} mice; this promotes through TNFR2 (tumor necrosis factor receptor 2) the accumulation of proliferating oligodendrocyte progenitors.

These results demonstrate that TIMP-3 is important for re-myelination in the spinal cord during EAE. Absence of remission from EAE in TIMP-3^{-/-} mice is accompanied by a shift in TNF activation which could contribute to defective re-myelination through influencing the density of oligodendroglial precursor cells. This work contributes to our understanding of re-myelination and might lead to new therapeutic approaches for the patients with MS.

2. Einleitung

2.1 Multiple Sklerose

Die Multiple Sklerose (MS) stellt die häufigste demyelinisierende Erkrankung des Zentralnervensystems (ZNS) dar und führt oft bereits im jungen Erwachsenenalter zur Arbeitsunfähigkeit. Es gibt ca. 2,5 Mio. Erkrankte weltweit (Compston and Coles, 2002). Die Prävalenz wird in Deutschland auf ca. 149,1 pro 100.000 Einwohner beziffert (Hein and Hopfenmuller, 2000). Bei einem Großteil der Fälle manifestiert sich die MS zwischen dem 20. und 40. Lebensjahr und weist einen polyphasischen Verlauf auf. Die epidemiologischen Daten von unter MS leidenden monozygoten Zwillingen weisen eine 35%ige Erkrankungskongruenz auf, sodass neben einer genetischen Prädisposition auch Umweltfaktoren eine wichtige Rolle in der MS-Ätiologie spielen (Compston and Coles, 2002). Hier sind unter anderem virale Infektionen zu erwähnen, die im Rahmen eines „Molecular-mimicry“-Phänomens eine Immunantwort gegen körpereigene Strukturen initiieren (Fujinami and Oldstone, 1985) (Olson et al., 2001). Im Rahmen der Multiplen Sklerose können abhängig vom topografischen Verteilungsmuster der demyelinisierten Plaques verschiedene neurologische Ausfälle auftreten. Neben typischen periventrikulär lokalisierten demyelinisierten Herden in der Corona radiata mit konsekutiven sensomotorischen Defiziten finden sich auch Läsionen im Hirnstamm oder im Kleinhirn. Letztere können zum Ausfall von Hirnnerven bzw. zu einem Kleinhirn-Syndrom führen. Weiter kaudal gelegene spinale Herde können eine Querschnittssymptomatik und Blasenentleerungs- oder Mastdarmfunktionsstörungen bedingen.

Es gibt drei klinische Verlaufsformen: einen schubförmigen Verlaufstyp, eine sekundär chronisch progrediente Form sowie eine primär progrediente MS. Die klinische Heterogenität der MS spiegelt sich in der histomorphologischen und immunpathologischen Variabilität wider, aufgrund der Lucchinetti eine Einteilung der MS in vier Subtypen vorschlägt (Lucchinetti, 2008; Lucchinetti et al., 2000; Lucchinetti et al., 2004). Aus pathomorphologischer Sicht entstehen im ZNS multifokale Entmarkungsherde (Plaques), die zu einem Funktionsverlust der betroffenen Nervenbahnen führen. Diese Plaques entstehen auf dem Hintergrund einer inflammatorischen Reaktion, die vorwiegend von T-Lymphozyten, Makrophagen sowie B-Zellen vermittelt wird (de Rosbo and Ben-Nun, 1998; Franciotta et al., 2008; Lassmann et al., 2007). Nach erfolgter Antigen-Präsentation nicht bekannter Faktoren

invadieren aktivierte T-Helfer-1-(Th1-)Zellen in Kooperation mit Th17-Zellen das ZNS und führen zusammen mit Makrophagen zum Myelinabbau. Obwohl die MS als eine autoimmune ZNS-Erkrankung angesehen wird, werden immer häufiger auch neurodegenerative Mechanismen diskutiert, die möglicherweise eine relevante Rolle insbesondere bei sekundär-chronisch und primär-chronisch verlaufenden Formen spielen können (Stadelmann, 2011; Stadelmann et al., 2011).

Da die Ätiologie der MS weiterhin unbekannt ist, werden neben klinischen Studien Tiermodelle zur Erforschung der MS-Pathogenese eingesetzt.

2.2 Experimentelle allergische Enzephalomyelitis

Die experimentelle allergische Enzephalomyelitis (EAE) ist ein Tiermodell für die Multiple Sklerose, das einzelne immunpathologische Mechanismen und lymphozytäre Interaktionen der MS imitiert. Es werden zwei EAE-Induktionsvarianten differenziert: eine aktive sowie eine passive EAE. Unabhängig von der Induktionsmethode entwickeln die untersuchten Labortiere, meist Mäuse, einen vergleichbaren klinischen Verlauf mit aufsteigenden Lähmungen (Lebar et al., 1986). Die aktive EAE wird ausgelöst, indem einem Tier Bestandteile der Myelinscheide (z.B. basisches Myelinprotein [MBP], Proteolipidprotein [PLP], Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein [MOG]) appliziert werden. Abhängig vom Immunogen, der Tierart und dem genetischen Hintergrund können deutliche klinische Unterschiede nach erfolgter EAE-Induktion registriert werden. So ist seit dem Jahr 1986 bekannt, dass in einigen Tierlinien durch die subkutane Applikation von Myelin-Oligodendrozyten-Glykoprotein (MOG) mit paralleler Gabe von Immunostimulatoren eine Immunreaktion gegen Bestandteile der Myelinscheide mit konsekutiver Entwicklung von aufsteigenden Lähmungen induziert werden kann (Lebar et al., 1986). In einer bahnbrechenden Arbeit von Mendel und Mitarbeitern wurde dargestellt, dass neben PLP und MBP auch die MOG₃₅₋₅₅-Applikation zu einer EAE-Entwicklung in BL/6-Mäusen führt, die als genetischer Hintergrund in einem Großteil der Experimente mit transgenen Mäusen verwendet werden (Mendel et al., 1995).

Die primär gegen das MOG gerichtete Immunreaktion richtet sich im Rahmen eines epitope-spreading auch gegen weitere Bestandteile der Myelinscheiden (Lehmann et al., 1992). Die erste passive EAE wurde im Jahr 1960 mit gegen Hirngewebe aktivierten Lymphozyten induziert (Paterson, 1960). Zur Untersuchung der MS löst man die

passive EAE durch Applikation von gegen Bestandteile der Myelinscheide aktivierten Lymphozyten aus. Die *Abbildung 1* präsentiert schematisch zwei Varianten der EAE-Induktion.

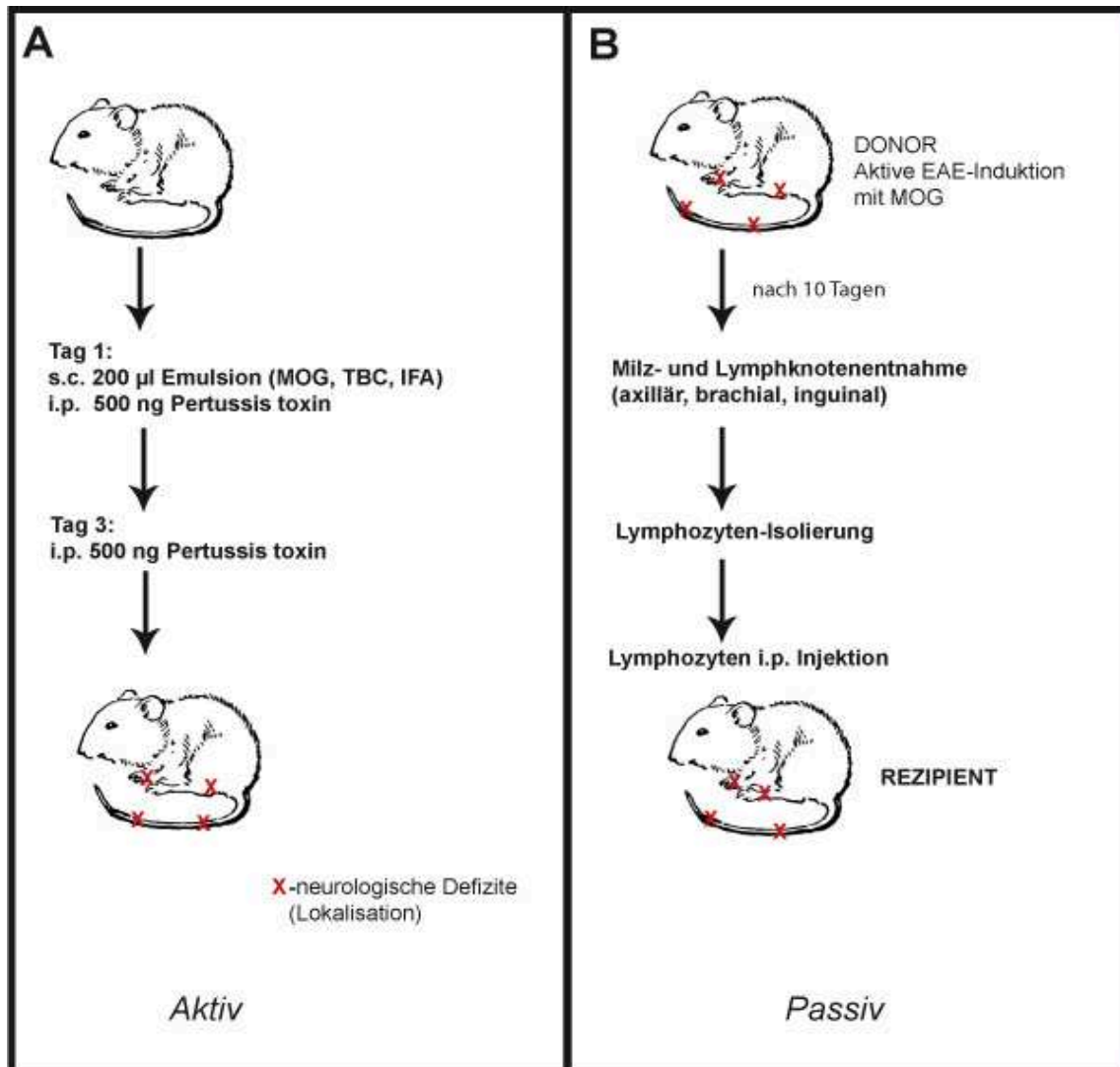


Abb. 1: Schematische Darstellung von aktiver und passiver EAE. A: Es wird eine Emulsion aus MOG, abgetöteten *Mycobacterium Tuberculosis* (TBC) sowie inkomplettem Freund-Adjuvans (IFA) angefertigt und subkutan appliziert. Parallel wird an Tag 1. und 3. Pertussis Toxin intraperitoneal verabreicht. **B:** Es werden gegen MOG aktivierte Lymphozyten isoliert, in vitro kultiviert und anschließend intraperitoneal einer Maus appliziert. Diese entwickelt eine EAE-Klinik.

Da neben der bekannten proinflammatorischen Zytokinen (z.B. IL-12, IL-17, INF- γ , TNF) auch Matrix Metalloproteinasen (MMP) und ihre Inhibitoren (TIMP, Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinases) eine wichtige Rolle für den Verlauf der EAE

aufweisen(Crocker et al., 2004; Mun-Bryce and Rosenberg, 1998; Pagenstecher et al., 1998; Rosenberg, 2009) wird im EAE-Modell eine gesteigerte gelatinolytische Aktivität im Liquor und im Hirngewebe beobachtet (Gijbels et al., 1993). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass MMP Myelinproteine verdauen (Chandler et al., 1995; Gijbels et al., 1993). In einer bahnbrechenden Arbeit wurde festgestellt, dass die therapeutische Anwendung eines synthetischen MMP-Inhibitors die Schwere der EAE-Klinik abschwächen kann(Gijbels et al., 1994). Somit wurde die wichtige regulierende Rolle von MMP auf den Verlauf der EAE belegt. Außerdem wurde von Pagenstecher und Mitarbeitern das vermehrte Vorkommen weiterer Mitglieder der MMP-Familie im Rahmen der EAE beschrieben(Pagenstecher et al., 1998). Zum Beispiel demonstrierten die Arbeiten von Thorne und Mitarbeitern sowie Crocker und Mitarbeitern, dass das Fehlen von TIMP-1 zu einer signifikanten Verschlechterung des EAE-Verlaufes führen kann (Crocker et al., 2006; Thorne et al., 2009).

2.3 Metalloproteinasen und ihre Inhibitoren

2.3.1 Matrix-Metalloproteinasen (MMPs): Struktur und Funktionen

Die Matrix-Metalloproteinasen (MMPs) mit bis dato 23 bekannten humanen Mitgliedern gehören zur großen Proteinfamilie der Zinkendopeptidasen (Crocker et al., 2004) und sind in sechs Subgruppen unterteilt: Kollagenasen, Gelatinasen, Stromolysine, Matrilysine, Membran-Typ-MMPs (MT-MMPs) und sonstige MMPs (Visse and Nagase, 2003). MMPs weisen strukturell neben der Propeptid-Region drei weitere Domänen auf: eine Hämpexin-Domäne, eine transmembranöse (TMD) sowie eine katalytische Domäne mit einem Zink-Ion (siehe *Abbildung 2*)(Murphy and Nagase, 2008; Nagase et al., 2006; Visse and Nagase, 2003). Die Hämpexin-Domäne besteht aus etwa 210 Aminosäuren und ist verantwortlich für die Bindung von Molekülen. Ein Teil der MT-MMPs (MMP-14, MMP-15, MMP-16 und MMP-24) weist strukturell eine transmembranäre Domäne auf. Die restlichen MT-MMPs (MMP-17 und MMP-25) besitzen einen Glykosylphosphatidylinositol-Anker (GPI-Anker), der eine wichtige Rolle bei der Verankerung des Enzyms in der Zellmembran spielt. Die katalytische Domäne besteht aus etwa 170 Aminosäuren mit einer Sekundärstruktur aus fünf β -Faltblättern und drei Helices auf (Nagase and Woessner, 1999).

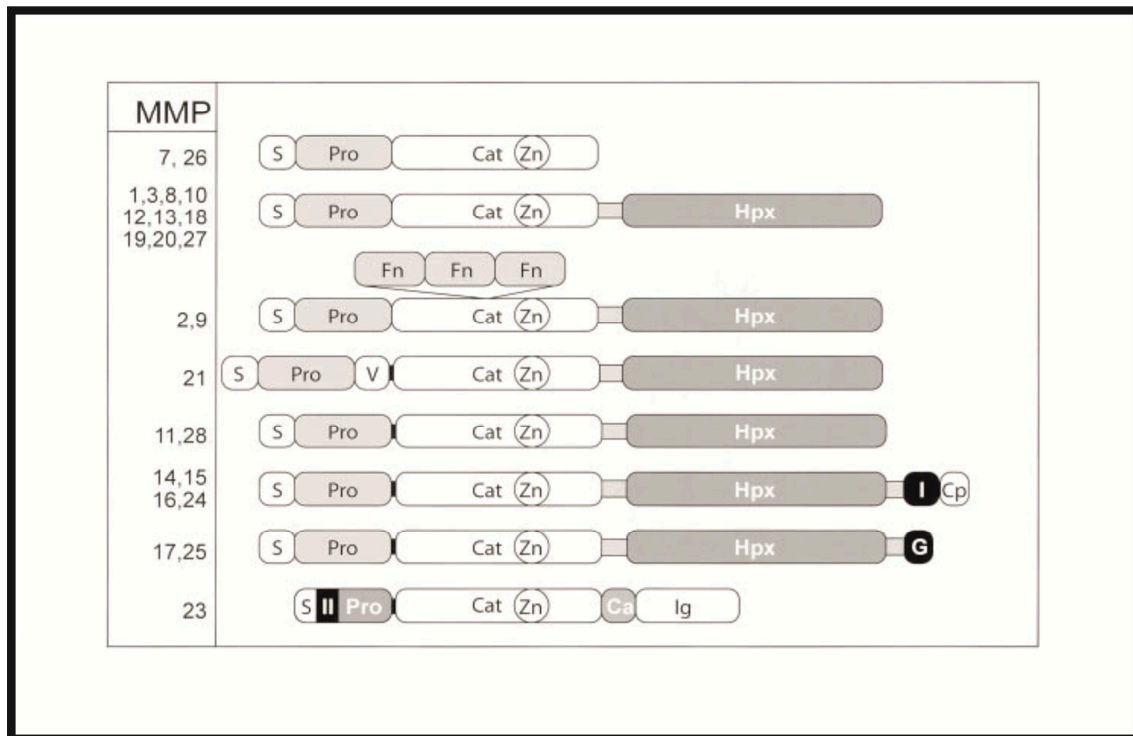


Abb. 2: Struktur der MMPs bei Wirbeltieren. Es werden neben der Propeptid-Region (Pro) eine transmembranöse Domäne Typ I (I), eine transmembranöse Domäne Typ II (II), eine Hämopexin-Domäne (Hpx) sowie eine katalytische Domäne mit einem Zink-Ion (Cat) unterschieden. Letztere kann optional eine Furin-cleavage-Region (Fn) beinhalten. Cp = zytoplasmatische Domäne. Die einzelnen MMPs können unterschiedliche Domänen-Sequenzen aufweisen (Visse and Nagase, 2003).

MMPs spielen eine herausragende Rolle sowohl bei der Aufrechterhaltung der Homöostase der extrazellulären Matrix, bei der Morphogenese als auch bei zahlreichen pathologischen Prozessen, wie Geschwülsten, Arthritis, Herzinfarkt und Hirninfarkt (Nagase et al., 2006; Visse and Nagase, 2003). Ferner regulieren sie die zelluläre Migration sowie Differenzierung, Wundheilung, Apoptose, Neovaskularisation und inflammatorische Prozesse (Nagase et al., 2006).

2.3.2 A Disintegrin and Metalloproteinase (ADAM)

Die aus circa 40 Mitgliedern bestehende ADAM-Proteinfamilie besitzt im Organismus zahlreiche Funktionen. So spielen die ADAMs unter anderem eine wichtige Rolle bei der Angiogenese, der Zellmigration, der Zelladhäsion, der Fusion von Myoblasten, der Organogenese, der zellulären Signaltransduktion und bei Entzündungen (Duffy et al., 2003; Reiss and Saftig, 2009; Saftig and Reiss, 2010; Stone et al., 1999; Tousseyn et al., 2006). Hier ist auch die wichtige Sheddase-Funktion der ADAMs zu erwähnen, d.h. die

Abspaltung der Extrazelluläranteile verschiedener Proteine und eine Freisetzung von löslichen Domänen. Demzufolge kann durch die Bindung der löslichen, abgespalteten Domäne an Rezeptoren anderer Zellen eine Zellreaktion initiiert werden (Duffy et al., 2003; Reiss and Saftig, 2009; Rosenberg, 2009; Saftig and Reiss, 2010; Stone et al., 1999; Tousseyn et al., 2006). Ein Beispiel hierfür ist ADAM-17, das auch als TNF Converting Enzyme (TACE) bezeichnet wird (*Brew and Nagase, 2010; Nagase et al., 2006*). ADAM-17 führt zur Abspaltung von TNF, der an eine Membran gekoppelt ist. Somit wird aus einer membranösen TNF-Form eine lösliche TNF-Form generiert, die eine proinflammatorische und proapoptotische Wirkung in EAE zeigt (Brambilla et al., 2011; Selmaj et al., 1991b). Letztere wird über den TNF/TNFR1-Signalweg erzielt, der ausführlich in der Arbeit von Arnett und Mitarbeitern an dem Cuprizone-Modell für Demyelinisierung vorgestellt wurde (Arnett et al., 2001).

2.4 Tissue Inhibitor of Matrix-Metalloproteinases (TIMP)

Die Tissue Inhibitors of Matrix Metalloproteinases (TIMPs) bilden eine Proteingruppe, die bei Säugetieren aus vier Mitgliedern besteht. Diese 21 bis 28 kDa großen Proteine weisen teils überlappende inhibitorische Funktionen gegenüber MMPs und Mitgliedern der ADAM-Familie auf (Rosenberg, 2009). Durch das breite Funktionsspektrum und das inhibitorische Profil tragen TIMPs unter anderem zur Regulation von Inflammation, Apoptose und Angiogenese bei. Die *Tabelle 1* zeigt den Aufbau und die Funktionen der humanen TIMP-Familie.

Tabelle 1: Zusammenstellung der wichtigsten Funktionen der humanen TIMP-Familie (Brew and Nagase, 2010)

Chromosomenlokalisierung und biologische Funktionen der vier Mitglieder der humanen TIMP-Familie				
Charakteristika	TIMP-1	TIMP-2	TIMP-3	TIMP-4
Chromosomenlokalisierung	X11p	17q	22q	3p
MMP-Inhibition	MMP-14, -16, -19, -24	alle	alle	fast alle
ADAM-Inhibition	ADAM-10	ADAM-12	ADAM-10, -12, -17, -28, -33, ADAMTS-1, -2, -4, -5	ADAM-17, -28, -33
Apoptose	inhibiert	inhibiert	inhibiert	stimuliert
Angiogenese	inhibiert	inhibiert	inhibiert	inhibiert

2.4.1 Struktur und Molekularbiologie von TIMP-3

Humanes TIMP-3 besteht analog zu den übrigen TIMPs aus einer C-terminalen und einer N-terminalen Domäne, wobei die N-terminale Domäne eine entscheidende inhibitorische Funktion besitzt (Brew and Nagase, 2010; Nagase et al., 2006). Dieses 24–27 kDa große Protein ist auf dem langen Arm des humanen Chromosoms 22 codiert und als einziger Vertreter der TIMP-Familie membranassoziiert (Brew and Nagase, 2010; Crocker et al., 2004; Nagase et al., 2006; Rosenberg, 2009). Die *Abbildung 3* zeigt schematisch den Aufbau des humanen TIMP-3.

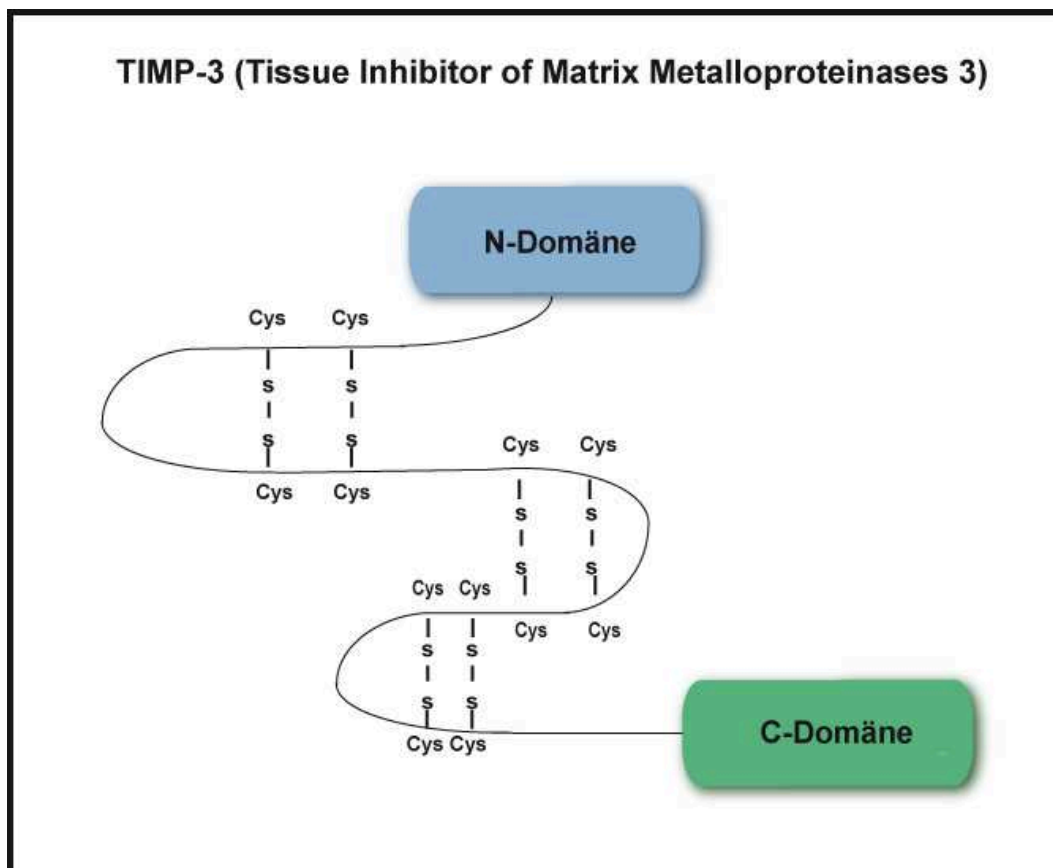


Abb. 3: Schematischer Aufbau von TIMP-3. Cys--S--S--Cys stellt die Disulfidbrücken zwischen Cysteinen dar.

2.4.2 Funktionen von TIMP-3

Das ubiquitär vorkommende TIMP-3-Protein wird in den inneren Organen (Herz, Niere, Thymus) sowie im zentralnervösen Gewebe inklusive des Plexus choroideus konstitutiv hoch exprimiert. Im ZNS wurde eine hohe TIMP-3-Expression vor allem im Kortex, im Thalamus, im Kleinhirn sowie in den nukleären Arealen des Hirnstammes nachgewiesen (Leco et al., 1994; Pagenstecher et al., 1998).

TIMP-3 ist ein potenter Inhibitor von MMPs und ADAMs. Es inhibiert in unterschiedlichem Maße die proteolytische Aktivität von allen MMPs (Rosenberg, 2009)(65) sowie einigen Mitgliedern der ADAM-Familie (z.B. ADAM-10, -12, -17, ADAMTS-4, ADAMTS-5). Zahlreiche Arbeiten an einem TIMP-3^{-/-}-Mausmodel mit konstitutivem Fehlen von TIMP-3 zeigten, dass diese Mäuse zahlreiche spontane morphologische Veränderungen aufweisen, wie eine chronische Hepatitis mit gestörter Regeneration (Mohammed et al., 2004) sowie eine Leberverfettung und eine Entzündung von Fettgewebe (Menghini et al., 2009), eine gestörte alveoläre Genese mit Degradation des Bronchialbaums (Gill et al., 2009; Leco et al., 2001), eine dilatative Kardiomyopathie (Fedak et al., 2004), eine gestörte choroidale Neovaskularisation der Retina (Janssen et al., 2008), eine kognitive Störung (Baba et al., 2009b) oder eine Arthritis (Sahebjam et al., 2007). Außerdem wirkt sich das Fehlen von TIMP-3 auf den Verlauf von pathologischen Prozessen aus, wie Förderung von Tumorwachstum und Metastasierung (Cruz-Munoz et al., 2006a; Cruz-Munoz et al., 2006b), oder erhöhte Mortalität nach einer intraperitonealen (i.p.) Lipopolysaccharid- (LPS-)Applikation (Smookler et al., 2006).

2.4.3 TIMP-3 bei physiologischen und pathologischen Prozessen im Zentralnervensystem

Durch die Inhibition der MMP-2-Aktivierung (Gelatinase A) zeigt TIMP-3 auch eine protektive Wirkung auf die Blut-Hirn-Schranken-Funktion(Liu et al., 2007). Ein weiterer Effekt des TIMP-3 betrifft die Inhibition einer apoptotischen Kaskade durch die Hemmung des TNF Converting Enzyme (TACE) und konsekutive Blockierung des apoptotischen Signalweges TNF/TNFR1 (Tumor Necrosis Factor/TNF Receptor 1) (Fata et al., 2001; Rosenberg, 2009). Des Weiteren inhibiert TIMP-3 die Angiogenese, indem der Vascular Endothelial Growth Factor 2 Receptor (VEGF2-Rezeptor) geblockt wird(Cruz-Munoz et al., 2006a). Sehr wichtig erscheint auch ein effizienter Abbau vom Amyloid-Precursor-Protein (APP), der von TACE aufrechterhalten wird (Hoe et al., 2007; Hoe and Rebeck, 2008). Da TIMP-3 auch die α -Sekretase (ADAM-10) inhibiert, führt eine TIMP-3-Überexpression zur Bildung von β -Amyloidablagerungen. Korrespondierend mit diesem Fakt konnte in humanen Hirnen mit Alzheimer-Erkrankung ein erhöhter TIMP-3-Spiegel registriert werden(Candelario-Jalil et al., 2009). Daraus ergibt sich, dass TIMP-3 im ZNS eine herausragende Bedeutung für physiologische und pathologische Prozesse besitzt.

2.5 Zielsetzungen der Arbeit

An TIMP-3^{-/-}-Mäusen sollten die Effekte des fehlenden TIMP-3 auf die EAE als Modell für eine entzündliche ZNS-Erkrankung evaluiert werden. Die vorliegende Arbeit sollte die folgenden Fragestellungen klären:

1. Führt das Fehlen von TIMP-3 zu einer Verschlimmerung des EAE-Verlaufes?
2. Erkennt man charakteristische histologische und immunhistochemische Unterschiede zwischen den TIMP-3^{-/-}-Mäusen und Wildtyp- (WT-)Mäusen? Dazu sollten Analyse und Evaluation der inflammatorischen Zytokinexpression in den TIMP-3^{-/-}- und WT-Tieren auf RNA-Ebene sowie auf Proteinebene erfolgen.
3. Erstellung eines Konzeptes zum Pathomechanismus möglicher klinischer und morphologischer Unterschiede nach erfolgter EAE-Induktion in den beiden Tiergruppen.

3. Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Chemikalien, Verbrauchsmaterialien

Agarose	Biozym, Hess. Oldendorf
Aqua iniectabilia	Delta Select GmbH, Dreieich
Blutglasskapillaren CLINITUBES TM D941-4.0	Radiometer, Kopenhagen, Dänemark
Chloroform	Merck, Darmstadt
DNase RQ1 Puffer 10x	Promega, Mannheim
DTT (Dithiotreitol)	Promega, Mannheim
EDTA (Ethyldiamintetraessigsäure)	Serva, München
Ethanol	Sigma Aldrich, München
Ethidiumbromid	Sigma Aldrich, München
Forane (Isofluran)	Baxter, USA
Isopropanolol	Fischer Scientific, Nidderau
MgCl ₂ (Magnesiumchlorid)	Thermo Scientific, Karlsruhe
Parafilm	American National Can, Chicago, USA
PCR-Strips	Biozym, Hess. Oldendorf
Pipettenspitzen (2–200 µl und 100–1000 µl)	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Pipettenspitzen (1–10 µl)	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Probenröhrchen (50 ml, 15 ml)	Kobe, Marburg
Reaktionsgefäße (2 ml; 1,5 ml; 0,5 ml)	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Safe Locks (0,5 ml)	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Phenol	Sigma Aldrich, München

Rotiophorese Sequenziergel Konzentrat	Carl Roth, Karlsruhe
Rotiophorese Sequenziergel Verdünner	Carl Roth, Karlsruhe
Rotiophorese Sequenziergel Puffer-Konzentrat	Carl Roth, Karlsruhe
[³² P]UTP (3000 Ci/mmol)	Perkin Elmer, Rodgau
Tissue-Tek [®]	Sakura Finetek, Staufen
Whatman Papier	Biometra, Göttingen

3.1.2 Allgemeine Puffer, Lösungen

Agarose-Gel

1 g LE-Agarose (BMA, Rockland, USA)

100 ml TAE-Puffer

7 µl Ethidiumbromid 10 µg/µl (Fluka, Neu-Ulm)

Eosin-Färbelösung

1 g Eosin in 100 ml 70 % Ethanol und 1 Tropfen 100 % CH₃COOH

Epon-812-Mischung (Harz)

Stammlösung A: 62 ml Epon 812, 100 ml DDSA, Stammlösung B: 100 ml Epon 812 mit 89 ml MNA

DNA-Ladepuffer (6x) für Agarosegel

0,25% Bromphenolblau, 0,25% Xylencyanol, 30% Glycerin in H₂O

DNA-Lyse-Puffer

200 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl (pH 8,3), 5 mM EDTA, 0,2% SDS (Pharmacia, Uppsala, Schweden), 100 mg/ml Proteinase K (PeproLab, Erlangen)

Hämatoxylin-Färbelösung

2 mg/ml Hämatoxylin; 0,2 mg/ml NaJO₃, 50 mg/ml KAl (SO₄)₂, 50 mg/ml C₂H₃Cl₃O₂

1 mg/ml C₆H₈O₇

Hybridisierungspuffer (1x)

40 mM PIPES (pH 6,4) 0,4 M NaCl, 1 mM EDTA in Formamid

Kresylechtviolett

10 g Kresylechtviolett (Waldeck GmbH & Co. KG, Division Chroma, Münster),
1000 ml H₂O, 10 Tropfen 100 % CH₃COOH

6 × Ladepuffer

0,25 % Bromphenolblau (Sigma, Saint Louis, MO, USA)

30 % Glyzerin und 0,25 % Xylencyanol (Merck, Darmstadt)

Luxolechtblau

1 g Luxolblau (Waldeck GmbH & Co. KG, Division Chroma, Münster); 1000 ml 100 %
Ethanol; 0,5 ml 100 % CH₃COOH

Präzipitationsmix

1,92 ml NH₄Ac5M(Merck, Darmstadt); 48 ml 100% EtOH(Carl Roth, Karlsruhe); 80 µl
tRNA(10 mg/ml, Roche Diagnostics)

Proteinase K (für 25 Proben)

200 µl Wasser, 150 µl SDS (10%), 60 µl Proteinase K (10 mg/ml in H₂O bidest.), 40 µl
Hefe-tRNA (10 mg/ml)

RNA-Ladepuffer für Polyacrylamidgele

80% Formamid (Fluka, Neu-Ulm), 1 mg/ml Xylencyanol FF, 1 mg/ml Bromphenolblau,
10 mM EDTA (pH 8,0)

RNase-Puffer (2,5 ml)

0,25 µl Tris-HCl(1 M; pH 7,5), 15 µl NaCl (5 M), 0,25 µl EDTA(0,5 M; pH 8,0), 5 µl
RNase A (100 mg/ml, Boehringer, Mannheim) und 1 µl RNase T1 (125 U/ml, Gibco
BRL, Grand Island, USA)

RNase-Puffer (Stock)

5 ml Tris pH 7,51M; 30 ml NaCl 5M; 5 ml EDTA 0,5M pH8; 460 ml Aqua bidest

RPMI

RPMI 1640(Sigma Aldrich), 10% FBS, L-Glutamin, HEPES, Penicillin/Gentamycin

PBS

80 g NaCl(Merk, Darmstadt); 11,5 g Na₂HPO₄(Carl Roth, Karlsruhe); 2,0 g KH₂PO₄(Merk, Darmstadt), pH auf 7,4 einstellen und Ad 10 l Aqua bidest

PCR-Puffer 10x Thermo Scientific, Karlsruhe

SDS (sodium dodecyl sulfat, 10%) Pharmacia, Uppsala, Schweden

T4 DNA Ligase-Puffer 10x Fermentas, St. Leon-Rot

T7 DNA Polymerase-Puffer 10x Fermentas, St. Leon-Rot

TE (Tris-EDTA) pH 8,0

10 mM Tris-HCl (pH 8,0), 1 mM EDTA (pH 8,0)

1 × TAE-Puffer

40 mM Tris Acetate; 20 mM CH₃COOH; 1 mM EDTA pH 8,0

5 x TBE-Puffer

1 Packung 10 x TBE-Puffer ad 2 l Aqua bidest(Ambion, USA)

TEMED (Tetramethylethyldiamin) Sigma Aldrich, München

Tris-Base Sigma Aldrich, München

Trizol Invitrogen, Karlsruhe

tRNA Roche Diagnostics, Basel

Xylencyanol Sigma Aldrich, München

3.1.3 Antikörper

Primäre Antikörper

Tabelle 2 : Zusammenstellung der verwendeten Primärantikörper

Antikörper/Herkunft	Hersteller	Verdünnung
CD4/Ratte, monoklonal	Pharmingen, San Diego, CA, USA	1:2000
CD8/Ratte, monoklonal	Pharmingen, San Diego, CA, USA	1:2000
Mac1/Ratte, monoklonal	MPI Freiburg, Thomas Stehle	1:500
NG2/Kaninchen, polyklonal	Chemicon AB5320	1:300
BrdU/Ratte, monoklonal	Acris	1:200
Caspase-3/Kaninchen, polyklonal	R&DSYSTEMS, Minneapolis, USA	1:500
GFAP/Kaninchen, polyklonal	Dako, Glostrup, Dänemark	1:000

Sekundäre Antikörper

Tabelle 3 : Zusammenstellung der verwendeten Sekundärantikörper

Antikörper	Hersteller
Vectastain-ABC-Kit:	Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA
HAM (horse anti mouse) Pferd anti Maus	
GAR (goat anti rabbit) Ziege anti Kaninchen	
RARat (rabbit anti rat) Kaninchen anti Ratte	
Immunfluoreszenz-Antikörper:	Invitrogen
GAR (goat anti rabbit) Ziege gegen Kaninchen (rot 546)	
GARat (goat anti rat) Ziege gegen Ratte (grün 488)	

3.1.4 Geräte

Digitalkamera Leica DFC 480	Leica Microsystems, Heerbrugg
Einbettautomat Leica TP 1020	Leica Instruments, Nussloch
Elektrophorese-Kammer, groß	Life Technologies, Karlsruhe
Elektrophorese-Kammer, RPA	Life Technologies, Karlsruhe
Entwickler, Röntgenfilme	Agfa, Köln
Kühlenzentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
Kühlenzentrifuge 5810R	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Laborwaage SC4010	Ohaus Scout, Sigma
Mikroskop Axioskop 20	Carl Zeiss MicroImaging, Göttingen
Mikroskop Leica DMR	Leica, Wetzlar
Mikrotom Leica CM 3050	Leica Instruments, Nussloch
Netzteil Powerpack 300	Bio Rad, München
Netzteil Powerpack 3000, RPA	Bio Rad, München
Paraffineinbettungsgerät Leica EG 1160	Leica Instruments, Nussloch
Photometer Ultrospec 3100 pro	Amersham, Freiburg
Pipetten (1000 µl; 200 µl, 100 µl, 20 µl, 2 µl)	Gilson, Limburg
Szintillationszähler LKB Wallac 1219	Bromma, Schweden
Thermocycler Biometra T1	Biometra, Göttingen
Thermomixer comfort	Eppendorf, Hamburg
Turrax ultra T10 basic	Ika Staufen
Videografikdrucker SONY-UP-D897	Sony GmbH

3.2 Methoden

3.2.1 Passive Induktion der experimentellen allergischen Enzephalomyelitis

Bei 8–12 Wochen alten weiblichen Mäusen wurde zunächst nach dem oben beschriebenen Procedere eine EAE aktiv induziert. Nach 10 Tagen wurden aus den axillären, brachialen und inguinalen Lymphknoten sowie den Milzen Lymphozyten isoliert. Dazu wurden die entnommenen Lymphknoten und Milzen in PBS aufgenommen. Mittels eines Spritzen-Stempels (aus einer 5 ml Spritze) sowie kleinen Sieben (70 µm Cell strainer) wurde Lymphknoten- und Milzgewebe gemörsert und anschließend in zwei separate neue Röhrchen überführt. Die entstandenen Suspensionen wurden für 5 Minuten bei 4 °C und 473 g zentrifugiert. Danach wurden die Überstände abgenommen. Lymphknotenfragmente wurden erneut in PBS-Lösung aufgenommen. Zu dem Milzgewebe-Pellet wurde ca. 1 ml Red Blood Cell Lysing Buffer (Sigma) pipettiert und alles für 3 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert, um eine Lyse der Erythrozyten auszulösen. Diese Reaktion wurde anschließend mit 1% FCS (Fetal Calf Serum, Sigma-Aldrich Steinheim) gestoppt. Nach einem erneuten Waschschriff mit PBS und nachfolgender Zentrifugation für 5 Minuten bei 4 °C und 473 g wurden die Pellets aus beiden Röhrchen in ein Röhrchen mit ca. 4–7 ml Zellkulturmedium (RPMI) überführt. Es folgte eine Lymphozytenzählung. Dafür wurden 10 µl Zellsuspension mit 500 µl Trypanblau vermischt und hiervon 10 µl in einer Neubauer-Zählkammer aufgenommen. Die Zellzahl wurde folgendermaßen errechnet:

Zellzahl in vier Eckquadraten x 51 (Verdünnung 1:51, 500 µl Trypanblau + 10 µl Zellsuspension) x 10000 (Kammerfaktor) x Volumen des Mediums mit Lymphozyten

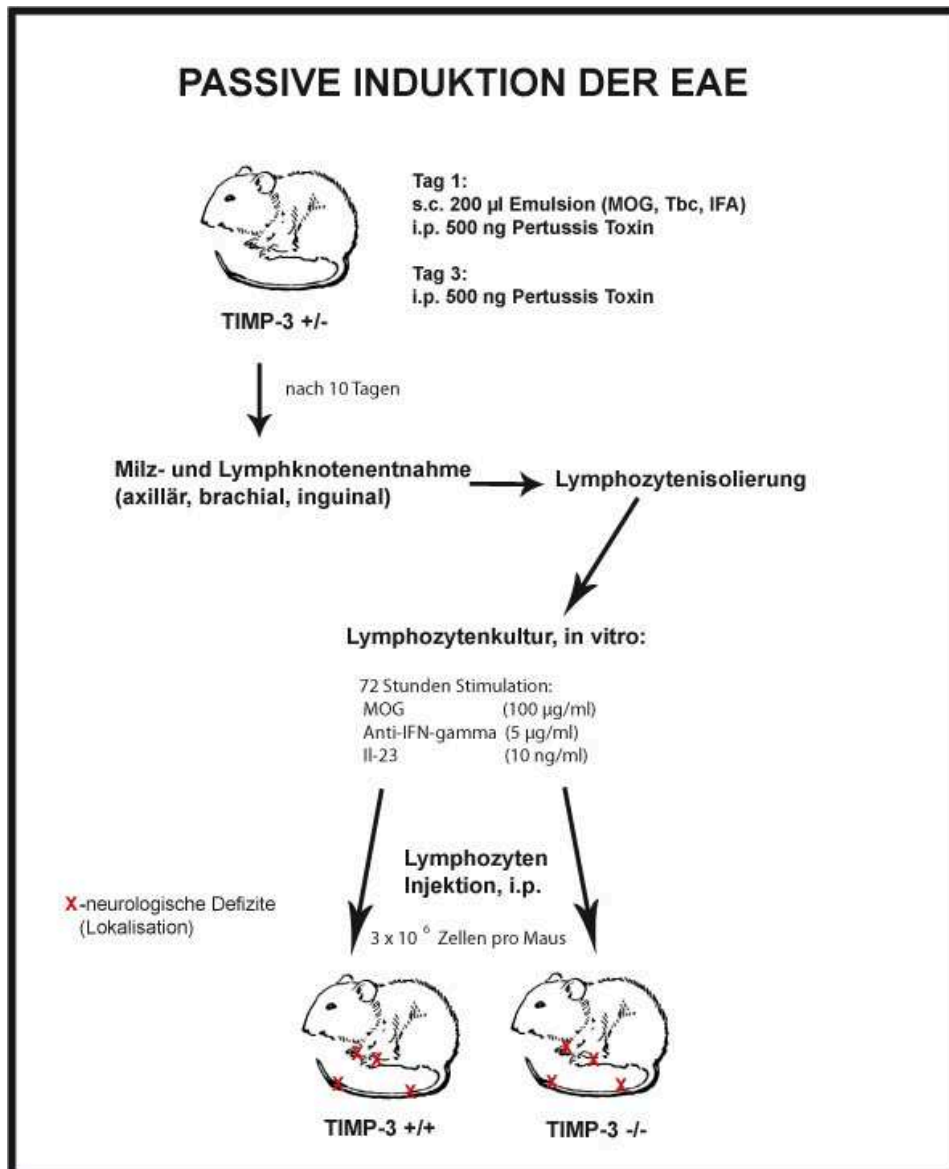


Abb. 4: Schematische Darstellung der passiven Induktion der EAE. Im ersten Schritt wurde bei heterozygoten (TIMP-3^{+/-}) weiblichen Tieren eine aktive EAE induziert. Nach 10 Tagen wurden Lymphozyten aus den entnommenen Milzen und Lymphknoten isoliert. Diese wurden nach 72-stündiger In-vitro-Stimulation (MOG, α -INF- γ , IL-23) intraperitoneal den zu untersuchenden Tierlinien appliziert.

Lymphozytenkultur

Die Lymphozyten wurden in 6-Well-Zellkulturplatten mit RPMI-Medium aufgenommen. Es wurde eine Zellkonzentration von maximal 5×10^6 Lymphozyten pro ml Medium angestrebt, da eine höhere Konzentration bei schnell proliferierenden Lymphozyten limitierend für die weitere Kultivierung gewesen wäre. Die Lymphozyten

wurden über 72 Stunden mit MOG (100 µg/ml), anti-IFN-gamma (5µg/ml) sowie IL-23 (10 ng/ml) inkubiert. Durch die Zugabe von anti-IFN-gamma und IL-23 wurde die Proliferation der Th1-Subpopulation unterdrückt, da IL-23 die Expression des IL-12-Rezeptors senkt, wodurch die IL-12-vermittelte Reifung der Th1-Subpopulation beeinträchtigt wird. Der Antikörper α -INF- γ inhibiert ebenfalls die Proliferation der Th1-Subpopulation durch Blockierung ihrer INF- γ -vermittelten Reifung.

Die Lymphozyten wurden mittels magnetischer Zellsortierung (MACS-System) getrennt. Dazu wurden sie mit Lymphozyten subtypisierenden Antikörpern markiert, an die magnetische Moleküle gekoppelt waren. Diese markierten Zellen (CD4-Lymphozyten) blieben aufgrund der magnetischen Eigenschaften in der Magnetsäule hängen. Die Durchflusszytometrie mit dem FACS (Fluorescence Activated Cell Sorter) wurde freundlicherweise in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Frau PD Dr. M. Huber im Labor der Abteilung für Medizinische Mikrobiologie, Universitätsklinikum Marburg, durchgeführt.

Schließlich wurden den Mäusen (TIMP-3^{-/-} und WT) 3×10^6 Lymphozyten (CD4-Subpopulation) intraperitoneal appliziert (siehe *Abbildung 4*).

3.2.2 Aktive Induktion der experimentellen allergischen Enzephalomyelitis

8–12 Wochen alten Mäusen (TIMP-3^{-/-} und WT) wurde nach Betäubung mit Isofluran (Forene) subkutan (s.c.) eine immunisierende Emulsion (200 µl) aus 200 µg MOG und 500 µg hitzeinaktivierten *Mycobacterium tuberculosis* (H37RA Difco) in 100 µl wässriger Lösung, die mit 100 µl inkomplettem Freund-Adjuvans (Sigma-Aldrich, F5506) emulgiert worden waren, injiziert. Parallel erfolgten am Tag 1 und 3 intraperitoneale (i.p.) Injektionen von 100–500 ng Pertussis-Toxin (siehe Ergebnisteil, 4.3.1.2). Nach 10–14 Tagen entwickelten die Tiere meist progrediente Lähmungen, die in einem Großteil der Tiere nach weiteren 10–14 Tagen weitgehend zurückgingen.

3.3 Phänotypische Untersuchungen an TIMP-3^{-/-}-Mäusen und Kontrollen (WT)

3.3.1 Beurteilung der Schweregrade der experimentellen allergischen Enzephalomyelitis (EAE)

Nach erfolgter EAE-Induktion wurden die Tiere täglich klinisch untersucht. Abhängig vom Ausmaß der neurologischen Symptomatik wurden die Befunde jeden Tag vermerkt und nach folgendem Prinzip graduiert: 1 – Schwanzlähmung, 2 – leichte Paraparese

und/oder Ataxie der Hinterbeine, 3 – schwere Paraparese der Hinterbeine, 4 – Tetraparese, 5 – moribund (siehe Abb. 5).

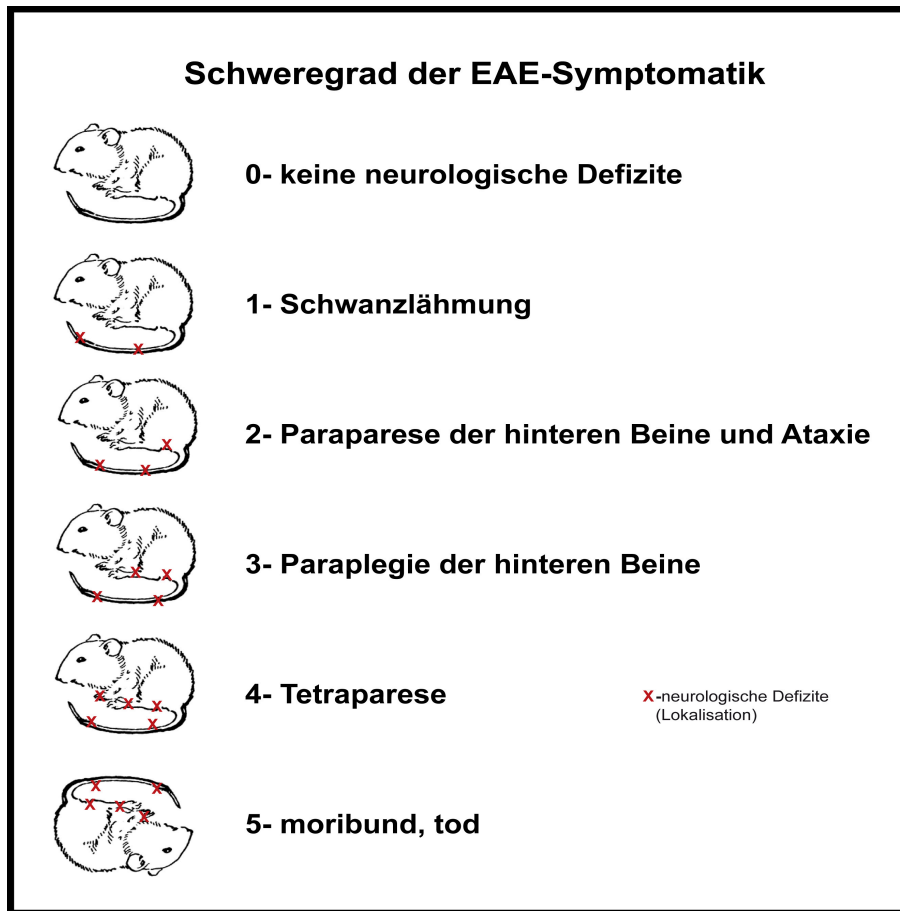


Abb. 5: Die Grafik stellt die klinische Graduierung der EAE-Symptomatik (Einteilung von 0 bis 5) abhängig von Ausprägung und Lokalisation der neurologischen Defizite dar. Mit einem roten „X“ wurde die Lokalisation der neurologischen Defizite markiert.

Im Verlauf der EAE-Symptomatik waren die Tiere dem Lähmungsgrad entsprechend behindert, waren allerdings zu normaler Nahrungs- und Wasseraufnahme in der Lage. Tiere mit ausgeprägten neurologischen Defiziten, deren Nahrungs- und Wasseraufnahme beeinträchtigt war, wurden aus Gründen des Tierschutzes getötet.

3.4 Morphologische und funktionelle Untersuchungen

3.4.1 Rückenmark-, Gehirn-, Blut- und Organentnahme, Weiterverarbeitung

3.4.1.1 Entnahme von Gehirn, Rückenmark und Organen

Nach Betäubung mit Forene (Baxter, Deerfield, USA) wurden die Mäuse dekapitiert. Die Schädelkalotten wurden mit einem bilateralen seitlichen Schnitt eröffnet und die Gehirne freipräpariert. Die freigelegten Gehirne wurden sagittal halbiert.

Zur Rückenmarkentnahme wurde die Lendenwirbelsäule mit einer Schere durchtrennt, eine Spritze mit gelber Pipettenspitze auf den Rückenmarkkanal aufgesetzt und das Rückenmark mit PBS nach kranial herausgespült. Für die Paraffinschnitte wurden neben einer ca. 0,3 cm dicken Scheibe aus einer Großhirnhälfte zwei Rückenmarkfragmente entnommen und anschließend in 4% Formalin fixiert. Für eine Kunststoffeinbettung wurden ca. 0,3 cm dicke Queranschnitte des Rückenmarks in 2,5% Glutaraldehyd-Lösung in Sörensen-Puffer fixiert.

Zur Entnahme der inneren Organe wurden die Bauchdecken mit einer Schere eröffnet und ca. 0,3 x 0,3 x 0,3 cm³ messende Gewebsfragmente von Lunge, Leber, Milz und Niere entnommen. Die Organfragmente wurden in 4% Formalin gepuffert in PBS fixiert.

3.4.1.2 Blutentnahme und Serumisolierung

Nach Betäubung mit Forene (Baxter, Deerfield, USA) wurden mit Heparin beschichteten Glaskapillaren (CLINITUBESTM D941-4.0, Radiometer, Kopenhagen) ca. 200 µl Blut aus dem retroorbitalen Venenplexus der Maus entnommen. Die Blutproben wurden 20 Minuten bei 1500 g und 4 °C zentrifugiert. Die obere Phase wurde in neue Reaktionsgefäße überführt und bis zur Zytokin-Analyse im Gefrierschrank bei -80 °C deponiert.

3.4.2 Anfertigung von histologischen Schnitten

Paraffinschnitte

In einem Einbettautomaten (Leica) erfolgte eine Entwässerung der Proben. Mit Paraffin durchtränktes Gewebe von inneren Organen, Großhirn- und Rückenmarkanteilen wurde in Paraffin eingeblockt. Für die Hämatoxilin-Eosin(HE)- und Klüver-Barrera(KB)-

gefärbten Paraffinschnitte sowie die Immunhistochemie wurden mit einem Mikrotom ca. 2–4 µm dicke Schnitte angefertigt, die auf beschichtete Superfrost-Plus-Objektträger aufgezogen wurden. Nach 15-minütiger Trocknungsphase bei 80 °C wurden die Schnitte für 2 x 15 Minuten in Xylol entparaffiniert und in einer absteigenden Alkoholreihe rehydriert (je 2 x 5 min 100 %, 97 %, 70 % Ethanol). Schließlich wurde die endogene Peroxidase über 18 Minuten in 0,3% H₂O₂ in PBS geblockt.

Kryostatschnitte

Zur Anfertigung von Kryostatschnitten wurde eine Großhirnhälfte mit einem längs und einem quer angeschnittenen Rückenmarkfragment auf eine ca. 3–4 mm dicke Korkplatte mit aufgezo- genem Tissue-Tek[®] positioniert und in mit flüssigem Stickstoff gekühlten 2-Methylbutan (Merck, Darmstadt) schockgefroren. Aus dem schockgefrorenen Gewebe wurden im Kryostaten ca. 5 µm dicke Schnitte angefertigt und auf einen beschichteten Superfrost-Plus-Objektträger aufgezogen. Anschließend wurden die Schnitte für ca. 3–5 Minuten in Methanol/Aceton (1:1) bei -20 °C fixiert und dann ca. 5 Minuten luftgetrocknet. Danach erfolgte eine Blockierung der endogenen Peroxidase für 10 Minuten mit 0,3% H₂O₂ in PBS mit nachfolgendem PBS-Waschschritt. Für RNA- und Proteinuntersuchungen wurden Teile der Großhirnhälften und des Rückenmarks in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bis zur Weiterverarbeitung bei -80 °C gelagert.

Kunststoffeingebettete Schnitte

Circa 3 mm dicke Rückenmarkquerschnitte wurden über 24 Stunden in 2,5% Glutaraldehyd-Lösung in Sörensen-Puffer fixiert und anschließend in Epoxidharz eingebettet. Danach erfolgte eine Färbung mit Toluidinblau, das in das Epoxidharz eindringt und den Gewebeschnitt in unterschiedlichen Blautönen anfärbt. Anschließend wurden 0,6 µm dicke Semidünnschnitte angefertigt.

3.4.3 Histochemie

Hämatoxylin-Eosinfärbung (HE-Färbung)

Die entparaffinierten Paraffinschnitte bzw. Kryostatschnitte wurden 5 Minuten in Hämalaun gefärbt und 10 Minuten unter fließendem Leitungswasser gebläut. Anschließend wurde 5 Minuten in Eosin gegengefärbt. In einer aufsteigenden Alkoholreihe (2 x 2 min 70 %, 95 %, 100 % Ethanol) sowie einer Xylolreihe (2 x 5 min

Xylol) wurden die Schnitte dehydriert und in Kunstharz (Eukitt) eingedeckelt. Bei dieser Färbung kommen die Kerne blauviolett sowie Zytoplasmata und andere Gewebestrukturen in verschiedenen Rotabstufungen zur Darstellung.

Klüver-Barrera-Färbung

Die entparaffinierten und rehydrierten Schnitte wurden über Nacht bei 56 °C in einer verschlossenen Küvette mit Luxolechtblau inkubiert. Danach wurden die Schnitte mit 70 % Ethanol und destilliertem Wasser gespült. Anschließend erfolgte eine Differenzierung mit 0,01 % NaOH-Lösung sowie 70% Ethanol, der eine erneute Spülung mit destilliertem Wasser folgte. Im nächsten Schritt wurden die Schnitte für 2 Minuten mit 0,1% Kresylviolett gegengefärbt und erneut mit destilliertem Wasser gespült. Nach Dehydrierung (siehe oben) wurden die Schnitte in Kunstharz (Eukitt) eingedeckelt. Bei dieser Färbung kommen Myelinscheiden türkisblau und Neurone violett zur Darstellung.

Berliner-Blau-Färbung

Nach der Dehydratation wurden die Paraffinschnitte 20 Minuten in einer 2% Kaliumhexacyanoferrat-(II)-Lösung bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 5 Minuten in Kernechtrot gegengefärbt.

3.4.4 Immunhistochemie (IHC) und Immunfluoreszenz

Nach dem PBS-Waschschritt wurden die Schnitte für 30 Minuten mit 100 µl 1% Ziegenerum blockiert, um eine unspezifische Färbereaktion zu vermeiden. Es erfolgte kein PBS-Waschschritt. Anschließend wurden die Schnitte über Nacht mit jeweils 100 µl eines primären Antikörpers inkubiert (Verdünnung siehe *Tabelle 2*, z.B. antiCD4 1:2000). Danach wurden die Schnitte 3 x für je 5 Minuten mit 100 µl PBS gewaschen. Anschließend wurden die Schnitte für 1 Stunde mit einem sekundären Antikörper (siehe *Tabelle 3*, z.B. Ziege-anti-Ratte-Antikörper, 1:200 mit 1% Ziegenerum in PBS) inkubiert. Alle weiteren Schritte erfolgten nach dem Standardprotokoll des Vectastain ABC Kits (Vectastain Laboratories, USA). Zunächst wurde der Avidin-Biotin-Complex angesetzt. Dazu wurden Reagenz A und Reagenz B in PBS aufgenommen und anschließend gemischt. Die Schnitte wurden 30 Minuten mit der ABC-Lösung inkubiert. Danach wurden sie mit DAB-Lösung ca. 10–12 Minuten entwickelt und die Reaktion schließlich mit 1x PBS abgestoppt. Die Schnitte wurden in destilliertes

Wasser überführt, 30 s mit Hämatoxylin gegengefärbt und 10 min unter fließendem Leitungswasser gebläut. In einer aufsteigenden Alkohol-/Xylolreihe (30 s 70 %, 95 %, 100 % Ethanol, 2 × 1 min Xylol) erfolgte die Entwässerung. Nach der Dehydratation wurden die Schnitte in Kunstharz (Eukitt) eingedeckelt.

Für Immunfluoreszenzuntersuchungen wurde die Schnitte über Nacht mit einem Primärantikörper (z.B. α BrdU, 1:200, siehe Tabelle 2) wie oben beschrieben inkubiert. Für eine Immunfluoreszenz-Doppelfärbung wurden sie gleichzeitig mit zwei Primärantikörpern (α BrdU, 1:200 und α NG2, 1:300, siehe Tabelle 2) inkubiert. Danach wurden die Schnitte 3 x für je 5 Minuten mit 100 μ l PBS gewaschen. Sie wurden dann für 1 Stunde mit sekundären Fluoreszenz-Antikörpern (GAR rot 546, 1:1000, und GARat grün 488, 1:2000) inkubiert. Schließlich folgte ein PBS-Waschschritt und die Schnitte wurden in Fluoromount G (Biotech) eingedeckelt.

3.5 Proliferationsassay von oligodendroglialen Progenitoren

3.5.1 Intraperitoneale Applikation von 5-Bromo-2'deoxyuridin (BrdU)

BrdU ist ein chemisches Analogon des Nukleosids Thymidin, mit dem man proliferierende Zellen markieren kann. Es weist anstelle der Methylgruppe in der C5-Position ein Brom-Atom auf und wird in die DNA proliferierender Zellen in der S-Phase eingebaut. Somit wurde BrdU auch in die proliferierenden oligodendroglialen Progenitoren im ZNS eingebaut, sodass proliferierende Zellen im ZNS mit α BrdU-Antikörper dargestellt werden konnten. BrdU wurde vom 14. bis zum 20. Tag nach der EAE-Induktion einmal täglich i.p. einer Maus (TIMP-3^{-/-} und WT) appliziert. Pro Maus wurden 120 mg BrdU/kg KG(pro Injektion) verabreicht.

3.5.2 Quantitative Analyse von proliferierenden oligodendroglialen Progenitoren

Mittels der o.g. Immunfluoreszenz-Doppelfärbung mit BrdU und NG2 konnten im Rückenmark der untersuchten Tierlinien (TIMP-3^{-/-} und WT) proliferierende oligodendrogliale Progenitoren quantitativ erfasst werden. Diese Zellen wiesen grün angefärbte Kerne (α BrDU) sowie rot angefärbte Zytoplasmata (α NG2) auf. Um das Ausmaß der Remyelinisierung im Rückenmark der TIMP-3^{-/-}- und WT-Mäuse zu evaluieren, wurden die doppelt angefärbten Zellen (entsprechende den proliferierenden oligodendroglialen Progenitoren) in der weißen Substanz des Rückenmarks gezählt. Es

wurden jeweils separate Zellzählungen für den Bereich des entzündlichen Herdes (läsional) sowie im Bereich um einen entzündlichen Herd (periläsional) durchgeführt. Im quadratischen Bezirk der Größe $0,014 \text{ mm}^2$ wurden die doppelt gefärbte Zellen (entsprechend proliferierenden oligodendroglialen Progenitoren) sowie die Zellen nur mit grün gefärbten Kernen (entsprechend proliferierenden Zellen mit eingebautem BrdU) gezählt. Aus den 5 quadratischen Bezirken der Größe $0,014 \text{ mm}^2$ wurde jeweils läsional und periläsional der Mittelwert der nur BrdU⁺-gefärbten Zellen sowie der doppelt angefärbten BrdU⁺/NG2⁺-Zellen ermittelt. Es wurde jeweils ein Gesichtsfeld aus einem Schnitt pro Tier ausgewertet. Schließlich wurde der prozentuale Anteil der BrdU⁺/NG2⁺-Zellen an der Gesamtpopulation der BrdU⁺-Zellen bestimmt.

Parallel wurde die absolute Anzahl von BrdU⁺/NG2⁺-Zellen läsional und periläsional in den 5 quadratischen Bezirken der Größe $0,014 \text{ mm}^2$ ermittelt. Hier wurde ein Gesichtsfeld aus einem Schnitt pro Tier ausgewertet. Die Zählungen wurden ausschließlich in der weißen Substanz des Rückenmarks durchgeführt.

3.6 Methoden zur Arbeit mit DNA

3.6.1 DNA-Isolierung

Ohrstanzen von Mäusen wurden in 250 μl Lyse-Puffer und 2,5 μl PK pro Ohrstanze über Nacht bei 56°C auf dem Thermorüttler lysiert. Die Ansätze wurden dann in 1000 μl 100% Ethanol aufgenommen und 30 Minuten bei 20800 g zentrifugiert. Nach Absaugen der flüssigen Phase wurden die Pellets in 250 μl TE pH 7,4 aufgenommen und im Thermorüttler bei 42°C für ca. 45 Minuten aufgelöst. Die so isolierte DNA ist kurze Zeit bei 4°C und längere Zeit bei -20°C stabil.

3.6.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Dieses molekularbiologische Verfahren ermöglicht es, ein gewünschtes DNA-Fragment zu multiplizieren. Die verwendeten Primer erkennen die komplementäre DNA-Region und flankieren den DNA-Abschnitt, der von einer Taq-Polymerase vervielfältigt werden soll. Zur Genotypisierung der im Projekt untersuchten Tierlinie TIMP-3^{-/-} wurden die in Tabelle 4 aufgelisteten Primer verwendet.

Tabelle 4: Zusammenstellung der verwendeten Primer

Primer	Sequenz von 5' nach 3'
AP T3Ex3 F (vorwärts) Biomers, Ulm	TTC AGT AAG ATG CCC CAC G
AP T3Ex4 R (rückwärts) Biomers, Ulm	TAC ATC TTG CCT TCA TAC ACG
AP Neo (vorwärts) Biomers, Ulm	TGA CCG CTT CCT CGT GCT TT
AP Neo (rückwärts) Biomers, Ulm	AGT TTC TCC AGA GCT GGG TTG T

Pro 25 µl PCR-Ansatz wurde der in Tabelle 5 aufgeführte Master-Mix sowie 1 µl an verwendeter Ohrstanzen-DNA eingesetzt.

Tabelle 5: Zusammensetzung des Master-Mixes

Substrat	[µl]	Endkonzentration	Hersteller
H ₂ O	16,45 µl		
Mg (Cl) ₂ (25 mM)	2,5 µl	2,5 mM	Abgene, Epsom
PCR-Puffer I 10x:	2,5 µl		Abgene, Epsom
Tris-HCl (100 mM)		10 mM	
KCl (500 mM)		50 mM	
MgCl ₂ (15 mM)		1,5 mM	
dNTP (10 mM)	0,5 µl	0,2 mM	Abgene, Epsom
AP T3Ex4 F (111 ng/ml)	0,5 µl	2,2 ng/µl	Biomers, Ulm
AP T3Ex4 R (111 ng/ml)	1 µl	4,4 ng/µl	Biomers, Ulm
AP Neo (111 ng/ml)	1 µl	4,4 ng/µl	Biomers, Ulm
Taq-Polymerase (125 U)	0,1 µl	0,5 U/µl	Thermo Scientific

Tabelle 6 zeigt das verwendete PCR-Programm für die Amplifikation.

Tabelle 6: PCR-Programm mit Temperaturangaben für die Amplifikation

Zyklen	Zeit	Temperatur	Vorgang
1	3 min	95 °C	Primäre Denaturierung der DNA
36	30 s	95 °C	Denaturierung der DNA
	30 s	56 °C	Anlagerung der Primer an die DNA
	30 s	72 °C	Verlängerung der Primer durch Taq-Polymerase
1	1 min	72 °C	Elongation am Ende

3.6.3 DNA-Gelelektrophorese

Die PCR-Produkte wurden jeweils mit 4 µl 6 × Ladepuffer gemischt und auf einem Ethidiumbromid-haltigen 1 % Agarose-Gel elektrophoretisch aufgetrennt. Als Größenmarker wurde der DNA-Leiter-Mix von MBI Fermentas, Vilnius, Litauen verwendet. Anschließend wurde das Gel mit UV-Licht beleuchtet. Banden von 634 Basenpaaren (bp) sprechen für ein TIMP-3-PCR-Produkt. Banden von 1000 bp entsprechen einer molekularbiologisch eingebauten Neomycin-Kassette (PGKneobpA), die ein TIMP-3-Defizit impliziert (siehe 4.1 und 4.2). Die heterozygoten Tiere wiesen 2 Banden mit 1000 bp und 634 bp auf.

3.7 Methoden zur Arbeit mit RNA

3.7.1 Extraktion und Quantifizierung von Gesamt-RNA

Schockgefrorenes Gewebe (Rückenmarkfragmente, eine Kleinhirnhemisphäre, eine Großhirnhemisphäre) wurde in vorgelegtem Trizol aufgenommen und für 20 Sekunden mit einem Turrax homogenisiert. Zwischen der Homogenisierung der einzelnen Proben wurde der Turrax-Stab jeweils 3 x mit entionisiertem Wasser gespült. Die Proben mit homogenisiertem Gewebe wurden für 2 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden 200 µl Chloroform pro 1 ml Trizol hinzugegeben und alles kräftig geschüttelt. Nach einer 10-minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Proben bei 11900 g und 4 °C zentrifugiert. Die wässrige obere Phase wurde in ein

neues Reaktionsgefäß überführt, in dem 0,5 ml Isopropanol pro 1 ml Trizol vorgelegt worden waren. Nach kräftigem Schütteln wurden die Proben 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend 10 Minuten bei 11900 g und 4 °C zentrifugiert. Das Isopropanol wurde vollständig abgesaugt. Auf dem Boden des Reaktionsgefäßes zeigte sich ein weißliches Pellet, das in 1 ml 75% EtOH pro 1 ml Trizol aufgenommen wurde. Die Proben wurden erneut 10 Minuten bei 7500 g und 4 °C zentrifugiert. Nach dem Waschschrift wurde der Alkohol vollständig abgesaugt und das Pellet für 10 Minuten in einem Vakuumkonzentrator (Speedvac) getrocknet. Danach wurde das Pellet in Tris pH 7,4 (100 µl für das Vorderhirn, 40 µl für das Kleinhirn, 30 µl für das Rückenmark) aufgenommen. Anschließend wurden die Proben für 10 Minuten im Thermoschüttler bei 40 °C inkubiert.

Zur Bestimmung der RNA-Konzentration erfolgte eine spektrophotometrische Analyse. 1 µl der zu untersuchenden RNA-Probe wurde in 99 µl Wasser gelöst. Anschließend wurde die Absorption dieser Proben im Spektrophotometer evaluiert.

3.7.2 RNase Protection Assay (RPA)

Der RNase Protection Assay (RPA) bietet eine schnelle, kostengünstige und breitgestreute Analyse der Messenger-RNA (mRNA), der die gleichzeitige semiquantitative Bestimmung der RNA-Expression mehrerer Gene erlaubt. Mittels einer radioaktiv markierten einsträngigen RNA-Sonde wurden doppelsträngige RNA-RNA-Hybride generiert. Diese Hybride sind gegen einen Verdau mit spezifischen RNAasen (A und T1) resistent, sodass nach erfolgtem komplettem Verdau der einsträngigen nicht hybridisierten RNA lediglich RNA-RNA-Hybride verblieben. Diese wurden anschließend denaturiert und in einem Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Die radioaktiv markierte geschützte einsträngige RNA wurde autoradiografisch dargestellt. Diese radioaktiven RNA-Fragmente spiegeln semiquantitativ die untersuchte mRNA-Expression wider.

3.7.2.1 Herstellung einer RNA-Sonde

Bei dieser Methode wurden verschiedene, teils in unserem Labor angefertigte Multi-Sonden-Sätze (siehe *Tabelle 7*) verwendet, die mittels molekularbiologischer Routine-Techniken hergestellt wurden.

Tabelle 7: Multi-Sonden-Sätze für den RPA

Probeset AP-4		Probeset AP-14		Probeset APO-1	
RNA-Sonden	Länge (bp)	RNA-Sonden	Länge (bp)	RNA-Sonden	Länge (bp)
TIMP-4	300	ADAM-11	319	Caspase-8	406
TIMP-3	281	ADAM-10	284	Caspase-3	325
TIMP-1	249	ADAM-19	265	Caspase-6	283
TIMP-2	200	ADAM-9	245	Caspase-11	253
α 2Macrog.	170	ADAM-12	225	Caspase-12	226
RPL32	78	ADAM-8	205	Caspase-2	202
		ADAM-17	183	Caspase-7	181
		ADAM-15	163	Caspase-1	163
		ADAM-23	143	Caspase-14	151
		ADAM-22	131	L32	112
		L32	78	GAPDH	97

In einem Reaktionsgefäß wurde der folgende Transkriptionsansatz angesetzt:

Substanzen	[μ l]	Endkonzentration	Hersteller
H ₂ O (a.i.)	5	1x	Promega, Madison, WI, USA
Transkriptions-Puffer (5x)	4		
40 mM Tris-HCl			
6 mM MgCl ₂			
2 mM Spermidine			
10 mM NaCl			
DTT (100 mM)	2	10 mM	Promega, Madison, WI, USA
dNTP-Mix (GTP, CTP, ATP)	1	2,5 mM	Promega, Madison, WI, USA
Probeset (z. B. ml-11)	1		
[³² P]UTP (3000 Ci/mmol)	5		
RNase-Inhibitor RiboLock (40U/ μ l)	0,5		Thermo Scientific, Fermentas GmbH
T7 RNA-Polymerase	1		Promega, Madison, WI, USA

Der Transkriptionssatz wurde durch Auf- und Abpipettieren gemischt und für 1 Stunde bei 37 °C im Thermocycler(Bio-Rad, München) inkubiert.

3.7.2.2 DNase Verdau und RNA Fällung

Nach der Synthese der radioaktiv markierten Antisense-RNA-Sonde wurde der Verdau der DNA-Matrize nach unten ausgeführtem Schema durchgeführt.

Substanzen	[µl]	Endkonzentration	Hersteller
H ₂ O (a.i.)	12	0,1 U/µl	Promega, Madison, WI, USA
10x DNase Puffer RQ1	2		
DNase 1 (RQ1, 1U/µl)	2		Ambion, Austin, USA

Nach Mischen durch Auf- und Abpipettieren wurde der Ansatz für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert. Nach der RNA-Sonden-Reinigung wurden 13 µl EDTA (20 mM, pH 8), 50 µl Phenol-Chloroform (1:1) sowie 2 µl tRNA (2 mg/ml) hinzugefügt. Nach ca. 30 Sekunden Vortexen wurde der Ansatz 5 Minuten bei 20800 g und RT zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Nach Zufügen von 50 µl Chloroform wurde der Ansatz 30 Sekunden gevortext und anschließend erneut 5 Minuten bei 20800 g und RT zentrifugiert. Die obere wässrige Phase wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt, in dem bereits 750 µl Präzipitationsmischung vorgelegt waren. Nach kurzem Schütteln und Vortexen wurde der Ansatz für mindestens 60 Minuten auf Trockeneis inkubiert. Danach wurde er 30 Minuten bei 20800 g und 4 °C zentrifugiert. Die Flüssigkeit wurde abpipettiert, das Pellet mit 100 µl 80% Ethanol gewaschen und für 10 Minuten bei 20800 g und 4 °C zentrifugiert. Die Flüssigphase wurde erneut abpipettiert, das Pellet bei RT circa 15 Minuten getrocknet und in 20 µl Hybridisierungspuffer aufgelöst.

3.7.2.3 Szintillationsmessung und Ansatz der Working Dilution

Aus dieser Mischung wurde je 1 µl in zwei separate Reaktionsgefäße überführt, in denen bereits 9 µl bzw. 99 µl Hybridisierungspuffer vorgelegt worden waren. Aus diesen zwei Lösungen (Verdünnung 1:10 und 1:100) wurde jeweils 1 µl für eine Messung im Szintillationszähler (LKB Wallac 1219 Rackbeta) eingesetzt. Die Sonde wurde so verdünnt, dass sie 500 DPM/µl/UTP-Rest im Sondenmix zeigte. Das errechnete Volumen der Sonde wurde mit 10 µl Hybridisierungspuffer gemischt. Diese Mischung wurde als Working Dilution bezeichnet.

$$WD = V(\mu l) + N \times 10 \mu l \text{ Hyb}$$

- WD – Working Dilution
- V – benötigtes Volumen der Sonde

- N – Anzahl der Proben
- Hyb – Hybridisierungspuffer

3.7.2.4 Hybridisierung, RNase Behandlung und Proteinase-K Verdau

Je 5 µg der zu untersuchenden RNA-Proben wurden in 0,5 ml Safe-Lock-Reaktionsgefäßen(Eppendorf, Hamburg) vorgelegt. Pro Probe wurden 10 µl Working Dilution (WD) hinzugefügt. Nach Vortexen und kurzem Zentrifugieren wurden die Proben über Nacht im Thermocycler(Programm-HYB: 94°C 10 Minuten und 56 °C 16 Stunden) inkubiert. Um die verbliebene nicht hybridisierte Einzelstrang-RNA zu verdauen, wurde ein Master-Mix (25 Ansätze) aus den folgenden Substraten zusammenpipettiert: 2,5 ml RNase Puffer(Stock), 1 µl RNase A sowie 1 µl RNase T1. Pro Probe wurde 100 µl Master-Mix verwendet. Nach Vortexen und kurzem Zentrifugieren wurden die Proben im Thermocycler für 45 Minuten bei 32 °C inkubiert. Da RNasen sehr stabile Enzyme sind, wurde zur Inaktivierung der RNasen ein Proteinase K-Verdau durchgeführt. Es wurde ein Master-Mix (25 Ansätze) aus den folgenden Substraten angefertigt: 235 µl H₂O (a.i.), 155 µl 10% SDS (RT), 30 µl tRNA (2 mg/ml) sowie 30 µl Proteinase K (10 mg/ml). Pro Probe wurden 18 µl Master-Mix verwendet. Nach Vortexen und kurzem Zentrifugieren wurden die Proben im Thermocycler für 30 Minuten bei 37 °C inkubiert.

3.7.2.5 Präzipitation der Hybride und Deaktivierung der RNAsen

Mittels einer Behandlung mit 150 µl Phenol-Chloroform (1:1) wurden aus den Proben die restlichen RNase-Fragmente entfernt. Nach Vortexen und kurzem Zentrifugieren bei 20800 g und RT wurde die obere Phase in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß mit vorgelegtem 750 µl Präzipitationsmix überführt. Anschließend wurden die Proben 30 Minuten auf Trockeneis inkubiert. Dem 30-minutigen Zentrifugieren bei 20800 g und 4 °C folgte das Absaugen der flüssigen Phase. Die Hybrid-Pellets wurden mit 150 µl eiskaltem Ethanol gewaschen und die Proben 15 Minuten bei 20800 g und 4 °C zentrifugiert. Nach Absaugen der flüssigen Phase und Lufttrocknung wurden die Proben in 6 µl Loading Buffer aufgenommen.

Parallel wurde ein Standard angefertigt. Dazu wurde die Working Dilution mit Hybridisierungspuffer 1:10 verdünnt und 1 µl von diesem Ansatz in 6 µl Loading

Buffer aufgenommen. Anschließend wurden alle Proben 3 Minuten bei 95 °C im Heizblock erhitzt und unverzüglich auf Eis deponiert.

Mit diesen Proben wurde ein Polyacrylamid-Gel beladen. Die ersten und letzten 4 Taschen wurden mit Loading Buffer befüllt. Dann wurden zunächst die Proben und zum Schluss der Standard aufgetragen.

3.7.2.6 Elektrophorese mit Polyacrylamid-Gel und Röntgenfilm-Entwicklung

Zur Auftrennung der RNA-Fragmenten nach ihrer Größe wurde ein Polyacrylamid-Gel aus den folgenden Reagenzien gegossen: 56 ml Sequenziergel-Verdünner(Carl Roth, Karlsruhe), 16 ml Sequenziergel-Konzentrat(Carl Roth, Karlsruhe), 8 ml Sequenziergel-Puffer(Carl Roth, Karlsruhe). Durch Zugabe von 640 µl 10% APS(Ammoniumperoxodisulfat, Carl Roth, Karlsruhe) und 32 µl TEMED(Tetramethylethylendiamin, Sigma Aldrich, München) wurde die Polymerisation von Acrylamid und Bisacrylamid gestartet. Die Gellösung wurde zügig mit einer Spritze zwischen zwei abgedichtete Glassplatten gegossen, die mit zwei Spacern auseinandergehalten wurden. Das polymerisierte Gel wurde schließlich in die Elektrophoresekammer eingespannt. Die Auftrennung der RNA-Fragmente erfolgte bei 60 W nach Größe. Die kleineren Moleküle wanderten am weitesten. Nach der Elektrophorese wurde das Gel entnommen, auf Whatmann-Papier aufgezogen, mit Zellophan bedeckt und auf einer Heizplatte bei 80 °C unter Vakuum 30 Minuten getrocknet. Das getrocknete Gel wurde mit einem Röntgenfilm in einer Röntgenkassette über 3 Tage bei -80 °C exponiert. Danach wurde der Röntgenfilm in einem Entwicklungsgerät (Agfa) entwickelt und schließlich eingescannt. Mit dem Programm Microtek Scan Wizard wurde das eingescannte Bild bearbeitet. Um die Expression optisch sichtbarer Banden quantitativ evaluieren zu können, wurde jede Bande mit der ImageJ-Software analysiert.

3.8 Methoden zur Arbeit mit Proteinen

3.8.1 Proteinextraktion

Das entnommene Gewebe wurde gewogen, mit Extraktionspuffer 1:10 (w/v) versetzt und anschließend auf Eis homogenisiert. Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte nach Bradford. 10 µl einer 1:100 verdünnten Proteinprobe wurden mit 200 µl

Bradford-Reagenz in einer Mikrotiterplatte (96-Well-Format) gemischt und anschließend die Extinktion bei 595 nm im ELISA-Lesegerät gemessen. Als Referenz wurde eine Verdünnungsreihe mit BSA verwendet.

<u>Extraktionspuffer</u>	<u>Bradford-Reagenz</u>
--------------------------	-------------------------

50 mM Tris pH 7,4	100 mg Coomassie Brilliant Blue G-250
-------------------	---------------------------------------

Nonidet P40 1%	50 ml 95% Ethanol
----------------	-------------------

EDTA 5 mM	100 ml 85% Phosphorsäure
-----------	--------------------------

Pepstatin A 5 µg/ml	ad 1000 ml dd H ₂ O
---------------------	--------------------------------

Complete 4%

3.8.2 Isolierung von löslichen und membranösen TNF-Formen

Um separat die Konzentrationen der membranösen und der löslichen TNF-Form zu bestimmen, wurden 100 µl Proteinextrakt in ein 0,5 ml Reaktionsgefäß überführt und 20 Minuten bei 4 °C und 10000 g zentrifugiert. Der Überstand (lösliche TNF-Form) wurde in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Das Pellet (membranöse TNF-Form) wurde in 100 µl Protein-Extraktionspuffer aufgenommen. Anschließend wurde jeweils die Proteinkonzentration nach Bradford gemessen.

3.8.3 Enzym-linked Immuno Sorbent Assay (ELISA)

Der TNF-ELISA wurde mit dem ELISA-System von PeproTech (Mini ELISA Development Kit, 900-M54) nach Herstellerangaben durchgeführt. Die eingesetzten Mikrotiterplatten wurden von der Firma Nunc Fisher Scientific, Schwerte bezogen. Proben, Kontrollen und Standards (PeproTech, Mini ELISA Development Kit, 900-M54) wurden in die Mikrotiterplatte pipetiert, in der bereits ein muriner Antikörper gegen TNF (Fängerantikörper) vorgelegt war. Nach einem Waschschrift wurde ein sekundärer biotinylierter Antikörper (Detektionsantikörper) aufgetragen. Durch Zugabe von Avidin-Meerrettich-Peroxidase (Avidin-HRP) bildeten sich Avidin-Biotin-Komplexe mit dem biotinylierten Sekundär-Antikörper aus. Nach Zugabe des chromatogenen ELISA-Substrates 2,2'-Azino-di-(3-ethylbenzthiazolin)-6-Sulfonsäure (ABTS), das von der gebundenen Peroxidase umgesetzt wurde, wurde die Färbereaktion mit einem Mikrotiterplatten-Lesegerät bei 405 nm gemessen. Die Intensität der Anfärbung war von der TNF-Konzentration abhängig. Die TNF-Konzentration konnte mittels einer Standardkurve evaluiert werden.

4. Ergebnisse

4.1 Etablierung des Mausmodells

Eine TIMP-3-defiziente Mauslinie (TIMP-3^{-/-}) wurde uns freundlicherweise von Herrn Dr. Heinrich Schrewe aus dem Max-Planck-Institut in Berlin zur Verfügung gestellt. Diese Tierlinie wurde primär auf einem 129/SvJ-Hintergrund generiert und die Gendefizienz dadurch erreicht, dass eine neo^r-Kassette in die HincII-Seite des Exons 3 eingebaut wurde. Die *Abbildung 6* zeigt schematisch den genomischen Einbau der Neomycin-Kassette (PGKneobpA), die eine TIMP-3-Expression limitiert. Die TIMP-3^{-/-}-Mauslinie wurde mehrmals auf den C57Bl/6-Hintergrund gekreuzt. Eine Rückkreuzung auf den C57Bl/6-Hintergrund war nötig, da das von uns verwendete Modell der EAE nicht auf dem 129/SvJ-Hintergrund funktioniert.

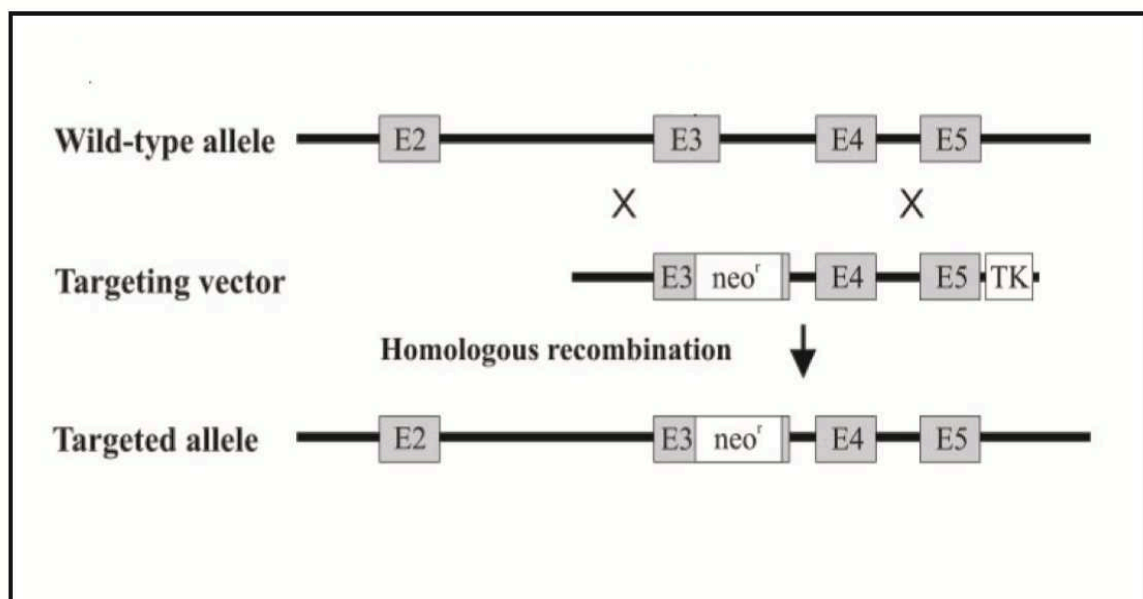


Abb. 6: Schematische Darstellung der eingebauten Neomycin-Kassette(neo^r) in das Exon 3 (E3) des TIMP-3-Genes (Janssen et al., 2008). E2, E3, E4 und E5 zeigen jeweils Exone.

4.2 Genotypisierung der TIMP-3^{-/-}-Mäuse

Auf dem Agarosegel zeigte die Genotypisierung der TIMP-3^{-/-}-Mäuse eine Bande von ca. 1000 Basenpaaren (bp). Die Wildtyp- (WT-)Tiere wiesen eine Bande von 634 bp

auf. Heterozygote Tiere ($^{+/-}$) zeigten zwei Banden, eine von ca. 1000 bp und eine von 634 bp.

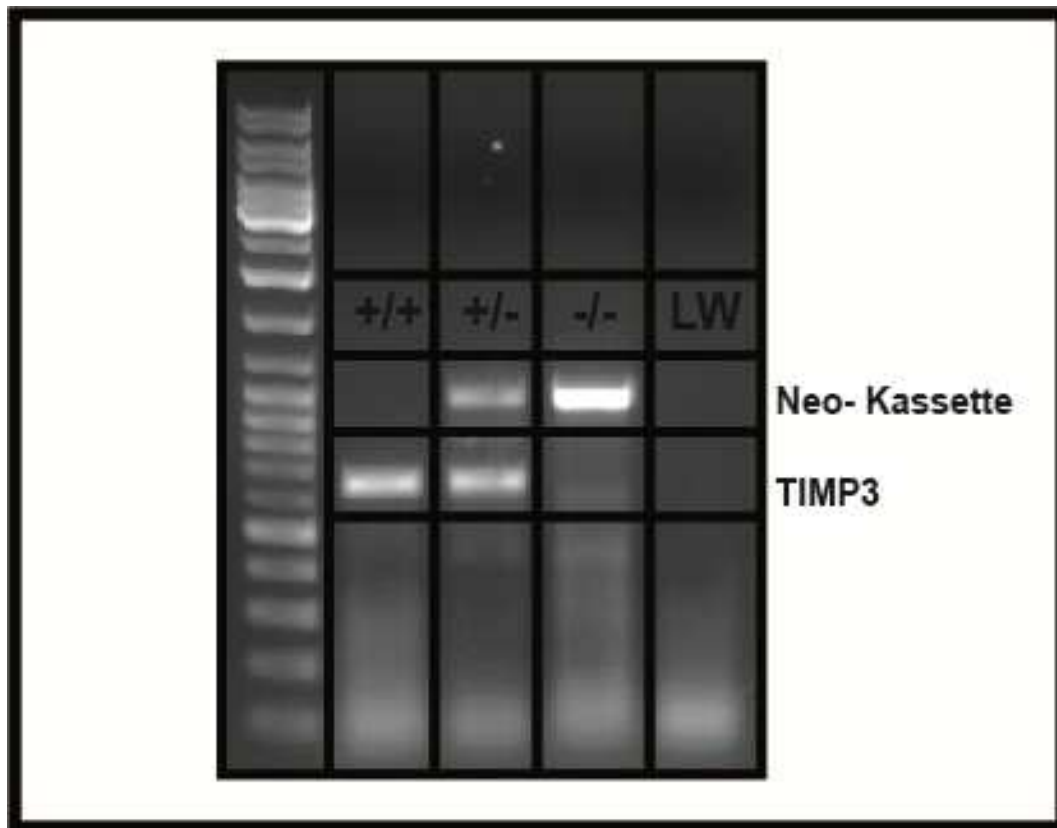


Abb. 7: Nachweis des TIMP-3-Genotyps mittels PCR. TIMP-3^{-/-}-Tiere wiesen ein einziges PCR-Amplifikationsprodukt von circa 1000 bp auf, Wildtyp-Tiere ($^{+/+}$) die Amplifikation eines Fragments von 634 bp. Die heterozygoten Tiere ($^{+/-}$) zeigten beide Banden.

4.3 Auswirkungen der TIMP-3-Expression auf den Phänotyp

4.3.1 Klinische Evaluation des EAE-Verlaufs

4.3.1.1 Klinische Evaluation der passiv induzierten EAE

Die primär stimulierten, gegen MOG aktivierten Lymphozyten wurden für 3 Tage in einer Zellkultur sekundär stimuliert (siehe 3.8.3). Nach der FACS-Analyse konnten der Empfänger-Maus 3×10^6 Lymphozyten (99,1% CD4-Zellen) i.p. appliziert werden. Der *Abbildung 8* sind die Konstellationen der Zell-Subpopulationen nach erfolgter magnetischer Zellsortierung zu entnehmen.

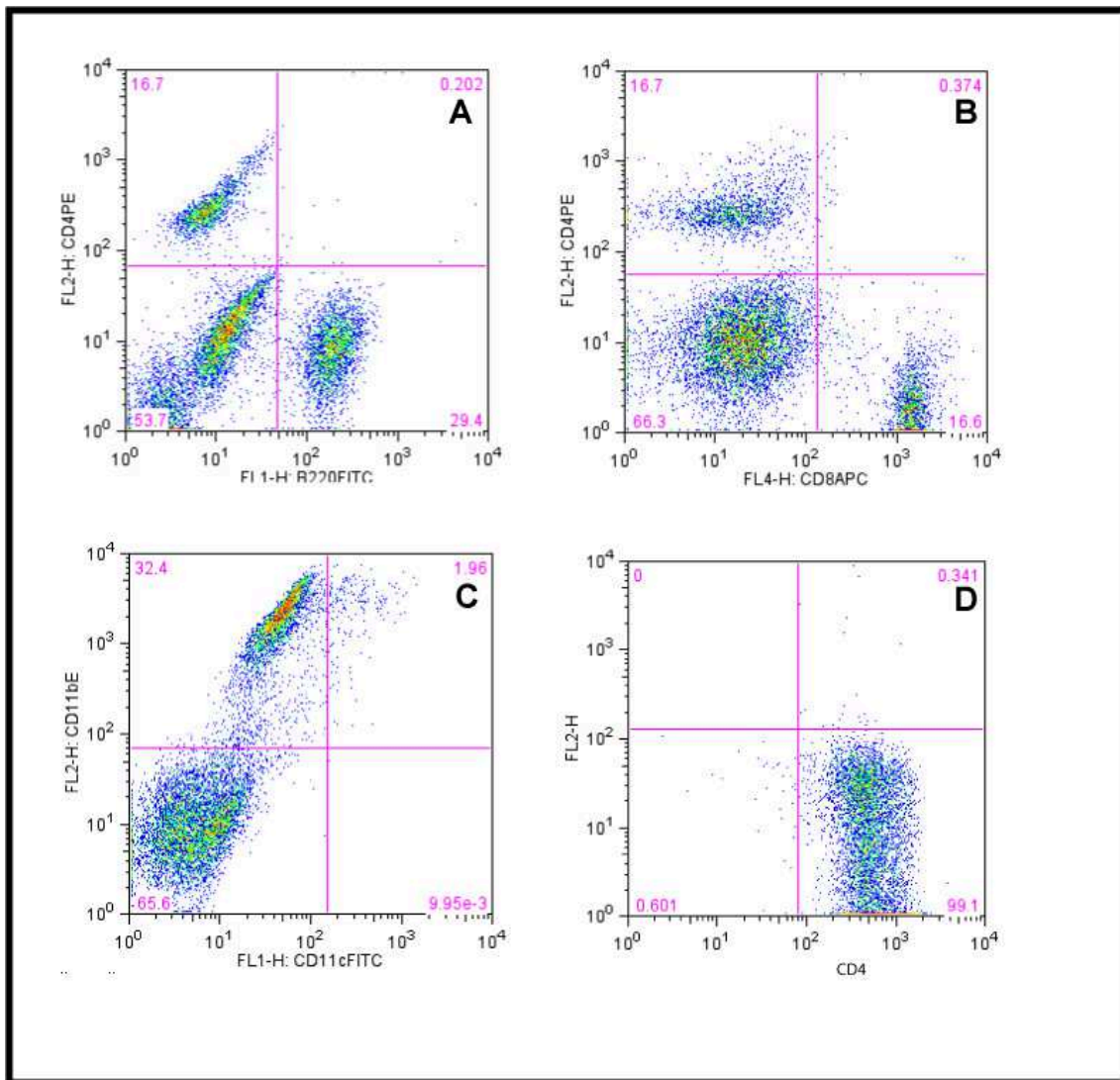


Abb. 8: A bis D: Histogramme der in vitro kultivierten Zellen aus einem EAE-Versuch mit erfolgter sekundärer Lymphozyten-Stimulation und Zellsortierung. A: Das Histogramm zeigt 16,7% CD4-Zellen und 29,4% B220-Zellen. B: Das Histogramm zeigt 16,7% CD4-Zellen, 16,6% CD8-Zellen. C: Das Histogramm zeigt 65,6% Monozyten sowie 32,4% Makrophagen. D: Das Histogramm zeigt 99,1% CD4-Zellen nach erfolgter magnetischer Zellsortierung. Diese Zellsuspension wurde im Rahmen des adoptiven Transfers intraperitoneal appliziert.

Die passiv induzierte EAE (5 Wildtyp- und 5 TIMP-3^{-/-}-Mäuse) zeigte eine vergleichbare Ausprägung im akuten Stadium bei beiden untersuchten Tierlinien (siehe Abb. 9). Am 15. Tag der EAE betrug die mittlere klinische Schwere der EAE bei den TIMP-3^{-/-}-Mäusen 2,8 (Standardabweichung: 0,38) und bei den WT-Mäusen 2,4 (Standardabweichung: 1,52). Ab der dritten Woche war eine im Vergleich zu WT-

Mäusen geringer ausgeprägte Remission bei den TIMP-3^{-/-}-Mäusen zu beobachten. Bis zum 40. Tag nach EAE-Induktion wiesen 80% der WT-Mäuse eine regelrechte EAE-Remission (Schweregrad ≤ 1) auf, während der Schweregrad bei allen untersuchten TIMP-3^{-/-}-Mäusen ≥ 2 betrug. Am 40. Tag der EAE zeigten die TIMP-3^{-/-}-Mäuse einen mittleren klinischen Schweregrad von 2 (Standardabweichung: 0,35) und WT-Mäuse einen mittleren Wert von 1,4 (Standardabweichung: 2).

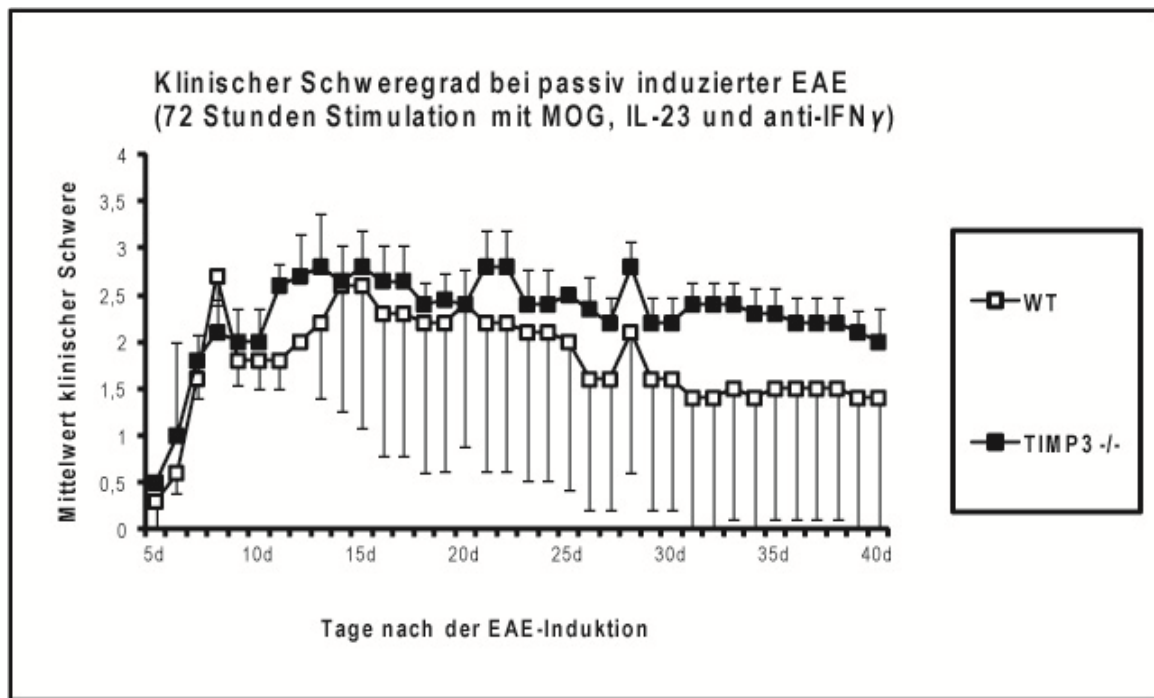


Abb. 9: Die Grafik präsentiert den Verlauf der Mittelwerte (mit Standardabweichung) der EAE-Krankheitsschwere nach passivem Transfer (Graduierung 0–5, 1 – Schwanzlähmung, 2 – leichte Paraparese der Hinterbeine und Ataxie, 3 – Paraplegie der Hinterbeine, 4 – Tetraparese, 5-moribund) über 40 Tage. (nWT = 5; nTIMP-3^{-/-} = 5)

4.3.1.2 Aktiv induzierte EAE – Etablierung des TIMP-3^{-/-}-Modells

In den ersten zwei Experimenten wurde die aktive EAE durch eine einmalige s.c. Injektion einer Emulsion (MOG, IFA, TBC, siehe Kapitel 3.2.1) und zweimalige i.p. Applikation von 500 ng Pertussis-Toxin (PTX) induziert. Unerwartet zeigten die TIMP-3^{-/-}-Mäuse (n = 11) eine deutlich erhöhte Mortalität von 36%. Die Tiere verstarben zwischen dem 15. und dem 26. Tag nach EAE-Induktion. Die Mortalität der WT-Mäuse (n = 5) betrug 20%; dieser Wert ist allerdings wegen der geringeren Anzahl der Tiere als weniger repräsentativ zu werten. Im ersten EAE-Experiment wurden als Kontrolle

C57BL/6-Mäuse (n = 5) eingesetzt, von denen bei diesem Experiment kein Tier verstarb. Die im Verlauf der EAE verstorbenen TIMP-3^{-/-}-Mäuse wiesen präfinal neben einer abdominalen Ödembildung eine schnellere Atemfrequenz auf. Eine Obduktion der Mäuse erbrachte retroperitoneale entzündliche Infiltrate (Abb. 10).

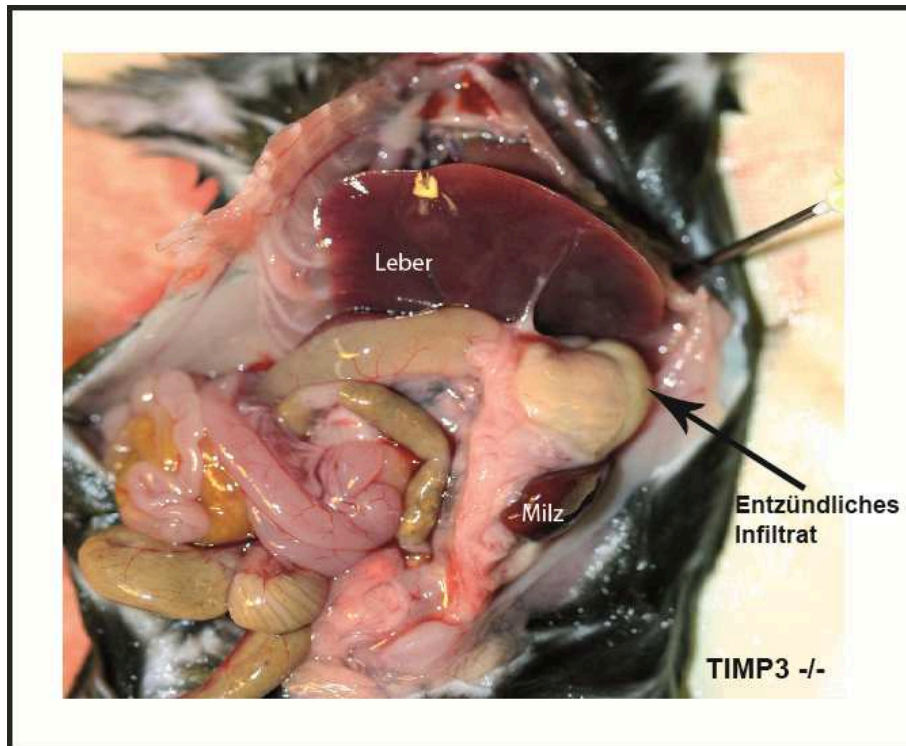


Abb. 10: Die inneren Organe einer im Verlauf der EAE verstorbenen TIMP-3^{-/-}-Maus nach Präparation der Bauchdecke. Es zeigt sich eine große, teils weißlich, teils gelblich angefärbte, retroperitoneal links lokalisierte entzündliche Infiltration (mit einem schwarzen Pfeil markiert).

Aufgrund der erhöhten Mortalität wurde das EAE-TIMP-3^{-/-}-Modell modifiziert. Die in unserem Labor übliche PTX-Dosis von 500 ng wurde auf 100 ng reduziert. Mit dieser PTX-Dosierung konnte die Letalität der TIMP-3^{-/-}-Mäuse (n = 21) auf 5% reduziert und die der WT-Mäuse (n = 22) ganz eliminiert werden (Abb. 11).

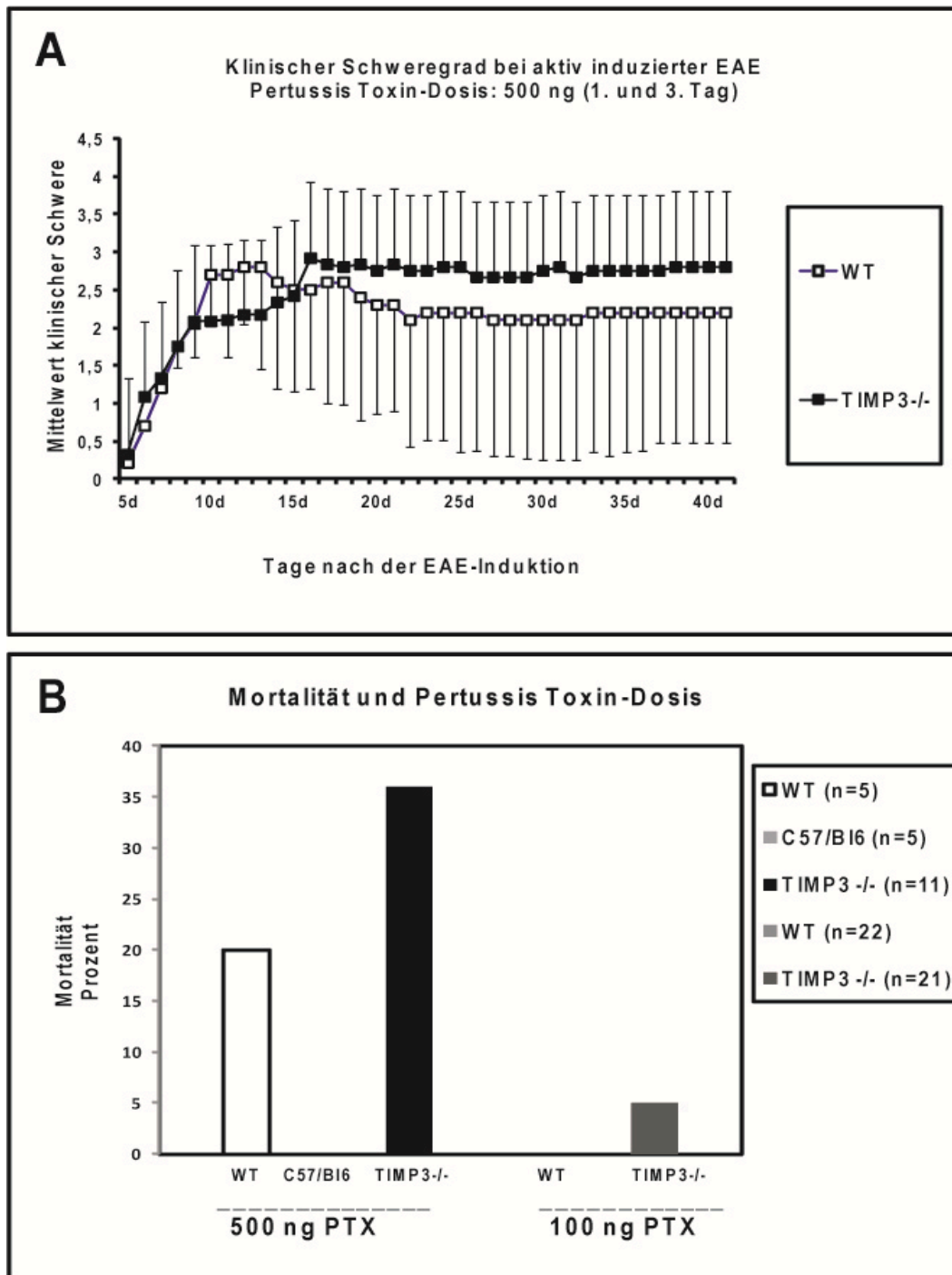


Abb. 11: A: Die Grafik präsentiert den Verlauf der Mittelwerte der EAE-Krankheitsschwere (Graduierung 0–5, 1 – Schwanzlähmung, 2 – leichte Paraparese der Hinterbeine und Ataxie, 3 – Paraplegie der Hinterbeine, 4 – Tetraparese, 5 – moribund) bei WT- (n = 5) und TIMP3^{-/-}-Mäusen (n = 11) über 40 Tage. Es sind die Mittelwerte sowie die Standardabweichung angegeben. B: Die Säulen zeigen die unterschiedliche Mortalität der TIMP3^{-/-}-, C57/Bl6- und Wildtyp-Tiere in Abhängigkeit von der applizierten Pertussis-Toxin-Dosis bei aktiv induzierter EAE.

Retroperitoneale Infiltrate bei TIMP-3^{-/-}-Tieren waren im modifizierten TIMP-3^{-/-}-Modell nicht erkennbar. Daher wurde für alle folgenden Experimente die Dosis auf 100 ng PTX pro Injektion reduziert.

Alle durchgeführten molekularbiologischen, histologischen und immunhistochemischen Untersuchungen sowie die statistische Analyse der klinischen EAE-Krankheitsschwere beziehen sich auf die aktiv induzierte EAE mit Applikation von 100 ng PTX pro Injektion.

Im Hinblick auf die Analyse der neurologischen Schweregrade zeigten die TIMP-3^{-/-}-Tiere ab der zweiten Woche einen höheren mittleren klinischen Schweregrad im 40-tägigen Beobachtungszeitfenster. Die klinische Schwere wurde nach dem 5-stufigem EAE-Score bestimmt (siehe Kapitel 3.3.1). Es wurden insgesamt vier separate EAE-Experimente mit reduzierter PTX-Dosis (100 ng) durchgeführt; eingesetzt wurden 22 WT- und 21 TIMP-3^{-/-}-Mäuse. In drei Experimenten wurden die Tiere über einen Zeitraum von 40 Tagen und in einem Experiment über 60 Tage klinisch begutachtet. Die *Abb. 12* zeigt den prozentualen Anteil der Tiere mit einem klinischen EAE-Schweregrad von mindestens 2 (≥ 2). Unabhängig von der Zeitspanne der Begutachtung zeigten die TIMP-3^{-/-}-Mäuse am Ende der Experimente einen prozentual größeren Anteil von Tieren mit schwerem neurologischem Defizit (EAE-Schweregrade ≥ 2) im Vergleich zur WT-Tiergruppe.

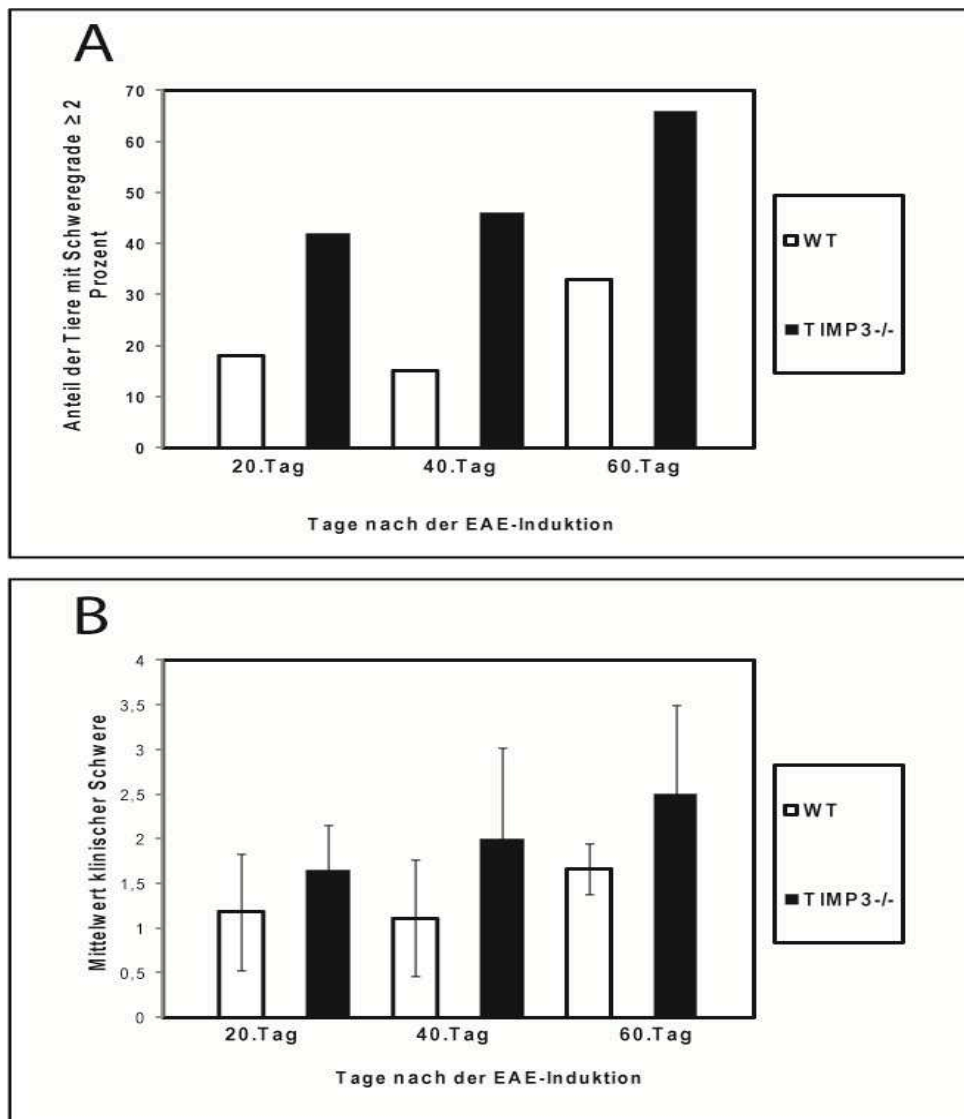


Abb. 12: A: Die Säulen zeigen das prozentuale Verteilungsmuster der Mäuse mit einem klinischen EAE-Schweregrad ≥ 2 an Tag 20, Tag 40 und Tag 60 des Beobachtungszeitraums. **B:** Die Säulen stellen die Mittelwerte (mit Standardabweichung) der klinischen EAE-Schweregrade an Tag 20, Tag 40 und Tag 60 des Beobachtungszeitraums dar (Tag 20: nWT = 22, nTIMP-3^{-/-} = 21; Tag 40: nWT = 13, nTIMP-3^{-/-} = 13; Tag 60: nWT = 3, nTIMP-3^{-/-} = 3).

In den insgesamt vier separat durchgeführten Experimenten zeigte sich jeweils eine gestörte Remission der Klinik bei den TIMP-3^{-/-}-Tieren. Die *Abbildung 13* zeigt den durchschnittlichen klinischen Schweregrad der aktiven EAE mit reduzierter PTX-Dosis. In allen Experimenten konnte ab der dritten Woche nach EAE-Induktion eine persistierende, teilweise progrediente neurologische Klinik bei den TIMP-3^{-/-}-Tieren registriert werden, währenddessen die WT-Mäuse im Verlauf eine Remission der EAE-

Klinik aufwiesen. Gleichzeitig zeigten beide Tierlinien einen ähnlichen Verlauf der frühen Phase der EAE mit dem Auftreten der ersten EAE-Symptome um den Tag 6 nach der EAE-Induktion.

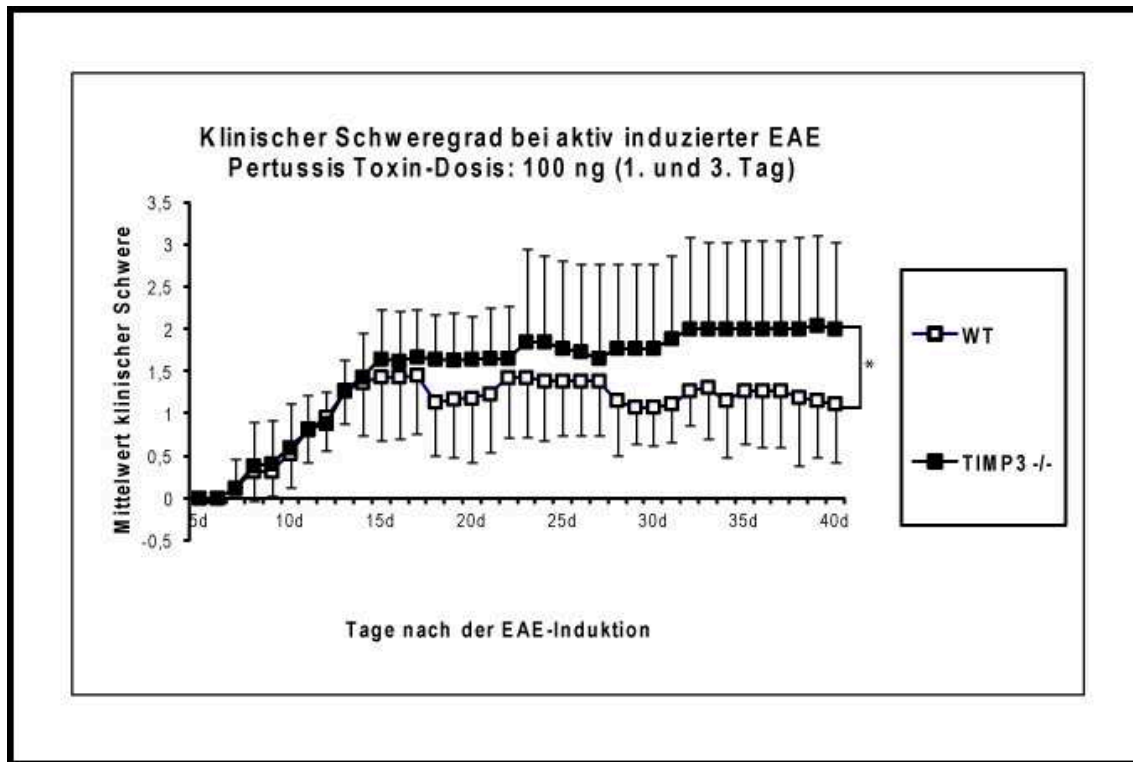


Abb. 13: Die Grafik zeigt den Verlauf der mittleren EAE-Krankheitsschwere (Graduierung 0–5, 1 – Schwanzlähmung, 2 – leichte Paraparese der Hinterbeine und Ataxie, 3 – Paraplegie der Hinterbeine, 4 – Tetraparese, 5 – moribund) bei WT- (n = 22) und TIMP-3^{-/-}-Mäusen (n = 21) über 40 Tage. Ein * p<0,05 kennzeichnet einen signifikanten Unterschied zwischen den untersuchten Mauslinien. Angegeben sind Mittelwerte und Standardabweichung.

Die statistische Auswertung wurde im Institut für Medizinische Biometrie und Epidemiologie der Universität Marburg durchgeführt. Für den Vergleich der klinischen Schweregrade wurde ein stratifizierter Mann-Whitney-U-Test angewendet. Die statistische Signifikanz wurde mit dem approximativen Wilcoxon-Mann-Whitney-Rangsummentest analysiert. Diese Untersuchungen ergaben, dass die TIMP-3-defizienten Mäuse unabhängig vom Geschlecht eine höhere EAE-Krankheitsschwere aufwiesen als die WT-Tiere. Die weiblichen TIMP-3-defizienten Mäuse zeigten eine diskret mehr ausgeprägte Klinik als die männlichen TIMP-3-defizienten Tiere 40 Tage nach EAE-Induktion (siehe Abb. 14). Diese Konstellation konnte bei WT-Tieren 40

Tage nach EAE-Induktion nicht beobachtet werden. Insgesamt zeigte es sich kein signifikanter Unterschied zwischen den Geschlechtern. Parallel wurde eine beeinträchtigte Remission der Klinik der TIMP3^{-/-}-Mauslinie beobachtet. Hier zeigte sich ein signifikanter Unterschied im Vergleich mit der WT-Linie am Tag 40 nach EAE-Induktion.

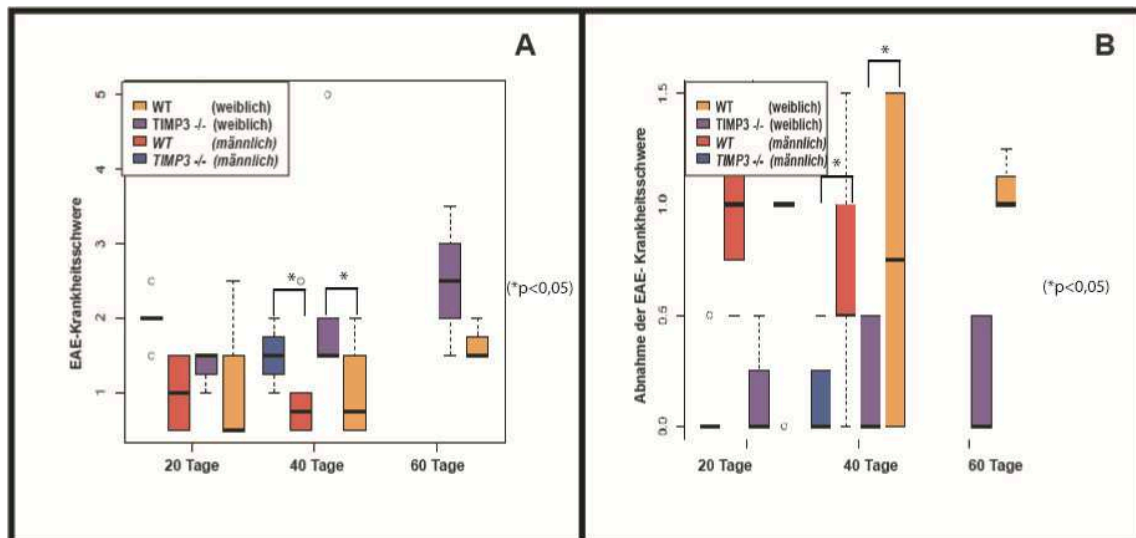


Abb. 14: Die Grafik stellt eine statistische Auswertung der maximalen EAE-Krankheitsschwere sowie die Ausprägung der EAE-Remission dar (die statistische Auswertung wurde von Frau Dr. Timmesfeld, Institut für Medizinische Biometrie und Epidemiologie der Universität Marburg, erstellt). A: Die Grafik zeigt die EAE-Krankheitsschwere am 20. Tag, 40. Tag und 60. Tag nach EAE-Induktion bei WT- (n = 22) und TIMP3^{-/-}-Mäusen (n = 21) unter Berücksichtigung des Geschlechts. Innerhalb der Boxen ist der Median eingezeichnet. Hier zeigt sich ein signifikanter Unterschied am 40. Tag nach EAE-Induktion (*p<0,05). B: Die Grafik zeigt den Vergleich der Abnahme der EAE-Krankheitsschwere zwischen dem maximalen klinischen EAE-Score und dem EAE-Score am Ende der Beobachtungszeit. Hier zeigt sich ein signifikanter Unterschied am 40. Tag nach EAE-Induktion (*p<0,05).

4.3.2 Histologische Besonderheiten der inneren Organe

Die PTX-Dosis von 500 ng führte bei den TIMP3^{-/-}-Mäusen zu massiven entzündlichen Infiltraten der Lungen mit mehrzeitigen Einblutungen sowie zu Entzündungen von Milz- und Lebergewebe. Die makroskopisch erkennbaren retroperitonealen Infiltrate in

den TIMP-3^{-/-}-Tieren stellten sich histologisch als subakute bis chronisch entzündliche Infiltrate dar. Parallel konnten zahlreiche nodulär konfigurierte, rundzellige, entzündliche Läsionen in der Leber nachgewiesen werden. Nierengewebe zeigte stellenweise einen destruierten Aufbau und diffuse hämorrhagische Imbibitionen. Bei Verwendung der reduzierten PTX-Dosis waren keine relevanten entzündlichen Veränderungen der inneren Organe erkennbar. Eine Zusammenstellung der morphologischen Veränderungen zeigt die *Abbildung 15*.

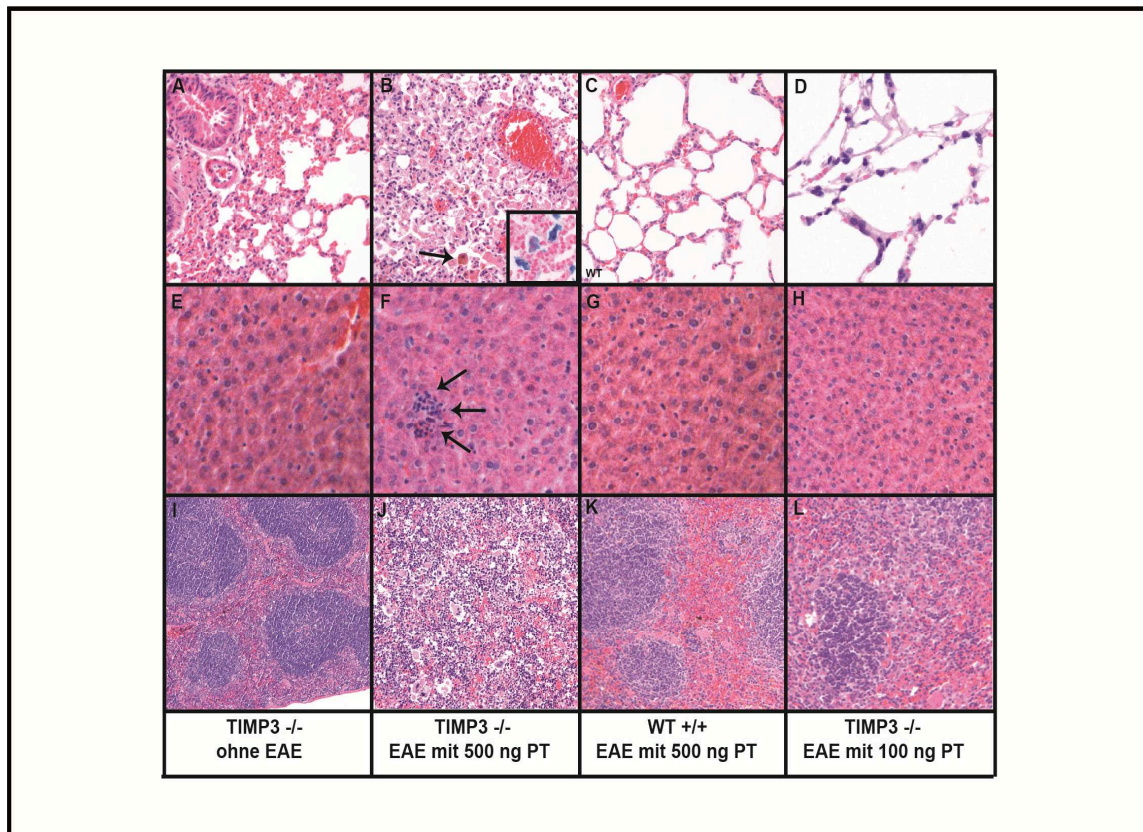


Abb. 15: Histologische HE-gefärbte Präparate der inneren Organe der TIMP-3^{-/-}- und der Wildtyp-Mäuse in Abhängigkeit von der applizierten Pertussis-Toxin-Dosis (PT). Die Bilder A, C und D zeigen regelrecht konfiguriertes Lungengewebe ohne relevante pathologische Veränderungen. B: Diffus entzündlich infiltrierte Lungengewebe mit mehrzeitigen Blutungen. Der Pfeil zeigt bräunlich angefärbte Siderophagen an, die mit einer Berliner-Blau-Färbung intensiv blau zur Darstellung kommen (B, Einschub unten rechts). Die Bilder E, G und H stellen regelrecht konfiguriertes Lebergewebe dar. F: Lebergewebe mit nodulär konfigurierten, rundzelligen, entzündlichen Infiltraten (Pfeile). Die Bilder I, K und L zeigen Milzgewebe mit weißen und roten Pulpaen. J: Aufgehobener anatomischer Aufbau vom Milzgewebe mit erkennbarem Verlust an Follikeln.

Mit einer Berliner-Blau Färbung konnten neben Siderophagen diffuse blau angefärbte extrazelluläre Hämosiderinablagerungen im Lungengewebe der TIMP-3^{-/-}-Mauslinie detektiert werden (siehe *Abb. 15 B*, Einschub).

4.3.3 Histologische Besonderheiten des Zentralnervensystems

4.3.3.1 Histologie des Zentralnervensystems

Die HE-gefärbten Präparate aus dem Rückenmarksbereich von beiden untersuchten Mauslinien (nWT = 9, nTIMP-3^{-/-} = 8) zeigten um den Tag 20 nach erfolgter EAE-Induktion keine relevanten Unterschiede bezüglich der Ausprägung entzündlicher, rundzelliger Infiltrate (siehe *Abb. 16*). Im Großhirn und im Kleinhirn konnten in beiden untersuchten Tierlinien vereinzelte entzündliche Läsionen nachgewiesen werden.

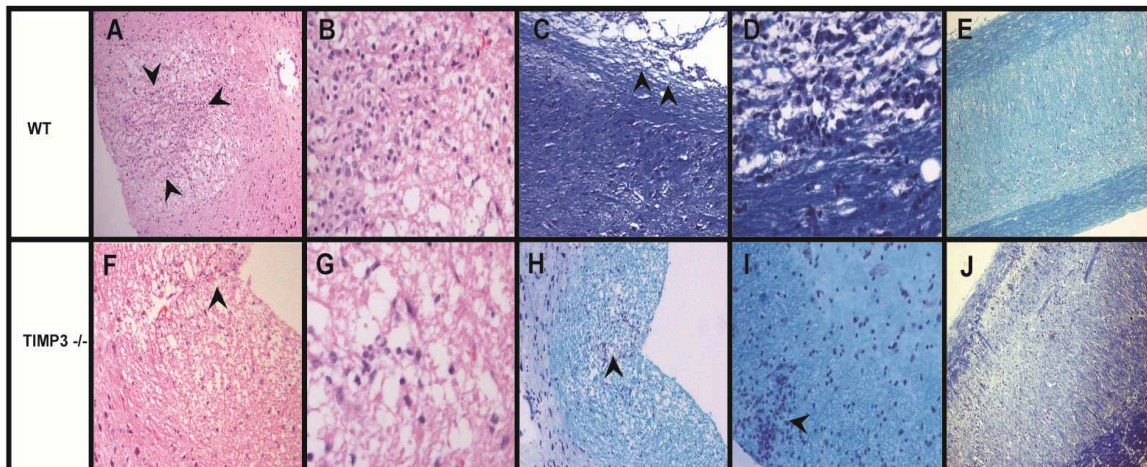


Abb. 16: Histologische Präparate des Rückenmarks von TIMP-3^{-/-}- und Wildtyp-Mäusen 20 und 40 Tage nach EAE-Induktion. A, B, C, D, F, G, H, I zeigen Präparate des Rückenmarks von TIMP-3^{-/-}- und Wildtyp-Mäusen (nWT = 9, nTIMP-3^{-/-} = 8) 20 Tage nach EAE-Induktion. A, B, F und G sind mit Hämatoxylin-Eosin (HE), die Präparate C, D, E, H, I und J mit Klüver-Barerra (KB) angefärbt. E, J zeigen Präparate des Rückenmarks von TIMP-3^{-/-}- und Wildtyp-Mäusen (nWT = 10, nTIMP-3^{-/-} = 10) 40 Tage nach EAE-Induktion ohne erkennbare entzündliche Infiltrate. Pfeilspitzen markieren entzündlich veränderte, teils demyelinisierte Läsionen mit rundzelligen Infiltraten.

40 Tage nach aktiv induzierter EAE waren trotz bestehender Klinik keine floriden entzündlichen Infiltrate erkennbar (nWT = 10, nTIMP-3^{-/-} = 10). Hervorzuheben ist, dass eine Demyelinisierung mit einer HE-Färbung nicht detektiert werden kann. Die

Klüver-Barrera-gefärbten Kryostatschnitte wiesen keine Unterschiede bezüglich der Ausprägung von demyelinisierten Herden auf, wobei die Beurteilung der Kryostatschnitte methodisch aufgrund geringerer Färbungsdifferenzierung eingeschränkt war.

4.3.3.2 Begutachtung des kunststoffeingebetteten Materials aus dem Rückenmark

In Toluidinblau-gefärbten Semidünnschnitten konnten um den 40. Tag nach der EAE-Induktion stellenweise komplett demyelinisierte Herde mit erkennbaren Myelinophagen im Bereich des Rückenmarks der TIMP-3^{-/-}-Tiere detektiert werden. Zeichen einer Remyelinisierung lagen nicht vor. Die WT-Mäuse wiesen dagegen neben komplett demyelinisierten Herden Areale mit einer reduzierten Dichte an myelinisierten Axonen auf (nWT = 4; nTIMP-3^{-/-} = 4). In beiden Mauslinien fanden sich zu diesem Zeitpunkt der EAE keine entzündlichen, rundzelligen Infiltrate mehr (siehe Abb. 17).

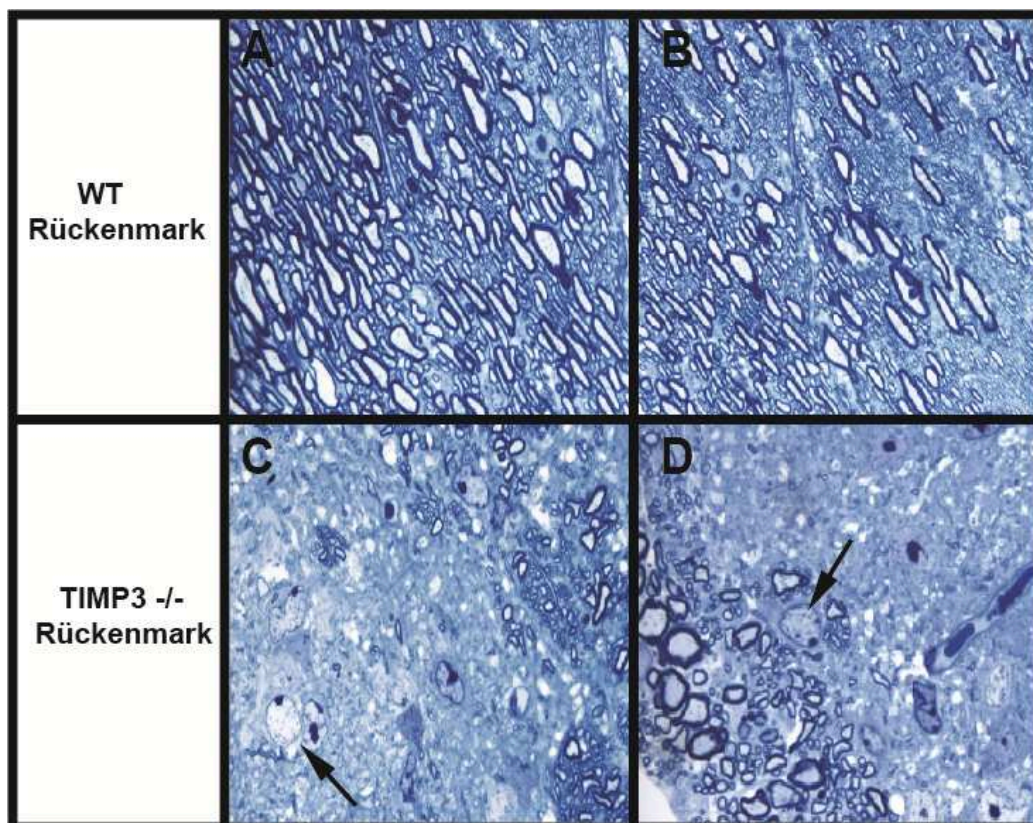


Abb. 17: Toluidinblau-gefärbte Semidünnschnitte aus dem Rückenmarksbereich.
A, B: Zu erkennen sind Areale mit einer reduzierten Dichte regelrecht myelinisierter Axone. **C, D:** Flächige, komplett demyelinisierte Herde mit resorbierenden Makrophagen (Letztere sind mit Pfeilen markiert).

4.3.3.3 Immunhistochemische Färbungen des Zentralnervensystems

Am 20. Tag nach EAE-Induktion konnten im Rückenmark der beiden Tierlinien vergleichbar ausgeprägte entzündliche, CD4-Zellen-dominante Infiltrate nachgewiesen werden. In einer immunhistochemischen Untersuchung für MAC-1 konnte neben resorbierenden Makrophagen eine ausgeprägte Mikroglia-Aktivierung im Rückenmark der TIMP-3^{-/-}-Mäuse detektiert werden. Die WT-Tiere wiesen im Vergleich nur eine diskrete Mikroglia-Aktivierung auf. Nach intraperitonealer BrdU-Applikation konnten immunhistochemisch BrdU-positive, proliferierende Zellen markiert werden, die zu einem Großteil noduläre Zellenansammlungen ausbildeten. Diese entsprachen überwiegend proliferierenden Lymphozyten (siehe Abb. 18), die gleichzeitig CD4-Immunreaktivität zeigten. Am 40. Tag und 60. Tag nach erfolgter EAE-Induktion traten keine lymphozytären entzündlichen Infiltrate auf.

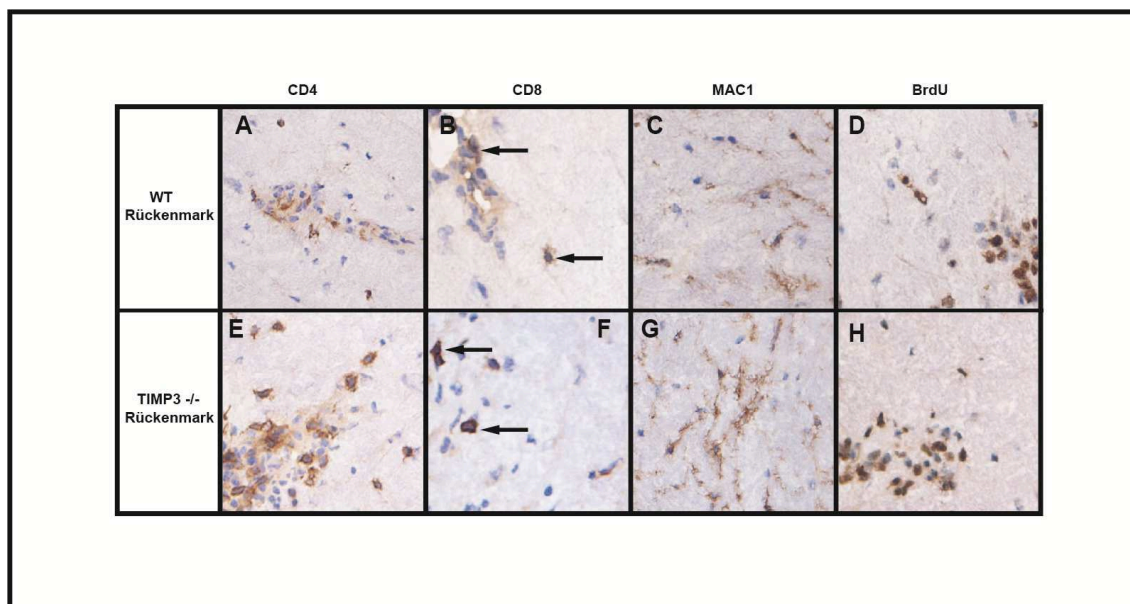


Abb. 18: Immunhistochemische Präparate des Rückenmarks von TIMP-3^{-/-}- und Wildtyp-Mäusen (20 Tage nach EAE-Induktion). A, E: Ansammlungen von CD4-T-Zellen. B, F: Pfeile markieren vereinzelte CD8-T-Zellen. C, G: Mikroglia-Aktivierung. Hier ist eine stärker ausgeprägte Mikroglia-Aktivierung im Rückenmark der TIMP-3^{-/-}-Mäuse zu erkennen (G). D, H: Rundzellige, entzündliche Infiltrate mit proliferationsaktiven und BrdU-markierten Zellen.

4.4 Proliferationsassay von oligodendroglialen Progenitoren (BrdU/NG2)

Die Doppelimmunfluoreszenz-Färbungen von BrdU und NG2 im Rückenmark ergaben noduläre, teils perivaskulär lokalisierte BrdU-positive (grün angefärbt, siehe *Abb. 19 A*) Zellansammlungen, die zum Großteil lymphozytären Infiltraten entsprachen. Ein Teil der BrdU⁺-Zellen wies parallel eine Immunreaktivität gegen NG2 auf. Diese Zellen sind proliferierenden oligodendroglialen Progenitoren zuzuordnen. Der Antikörper gegen NG2 markierte neben oligodendroglialen Progenitoren auch Gefäße (siehe *Abb. 19 F*). In der Zusammenschau der Befunde fand sich eine reduzierte BrdU⁺/NG2⁺-Zellzahl im Rückenmark der TIMP-3^{-/-}-Mauslinie. Dieses Phänomen zeigte sich sowohl im entzündlichen Herd (läsional) als auch um den Herd herum (periläsional). Die Zellzählung erfolgte jeweils in fünf 0,014 mm² großen Bezirken des Rückenmarks pro Tier von TIMP-3^{-/-} (n = 5) und WT-Mäusen (n = 5) (siehe Kapitel 3.5.2).

Tabelle 8: Prozentualer Anteil proliferierender oligodendroglialer Progenitoren an der Gesamtpopulation von BrdU⁺-proliferierenden Zellen, TIMP-3^{-/-} (n = 5) und WT-Mäusen (n = 5)

<u>BrdU⁺ /NG2⁺</u>	TIMP-3 ^{-/-} (n = 5)	WT (n = 5)
BrdU⁺		
Läsional	17,9 %	28,6%
Periläsional	38,6%	47,6%

Tabelle 9: Absolute Anzahl proliferierender oligodendroglialer Progenitoren BrdU⁺/NG2⁺ in 5 jeweils 0,014 mm² großen Bezirken, TIMP-3^{-/-} (n = 5) und WT-Mäusen (n = 5)

BrdU ⁺ /NG2 ⁺	TIMP-3 ^{-/-} (n = 5)	WT (n = 5)	p
Läsional	26 Standardabweichung: 0,9	28 Standardabweichung: 1,4	P<0,1928
Periläsional	52 Standardabweichung: 1,4	97 Standardabweichung: 2,8	*P<0,00832

In den läsionsfernen Bezirken fanden sich keine doppelt angefärbten Zellen im Bereich der weißen Substanz des Rückenmarks. Der prozentual dargestellte Anteil der BrdU⁺/NG2⁺-Zellen an der Gesamtpopulation von BrdU⁺-proliferierenden Zellen ist der Grafik in *Abbildung 20* zu entnehmen.

Die quantitative Analyse der absoluten Anzahl proliferierender oligodendroglialer Progenitoren (nWT = 5; nTIMP-3^{-/-} = 5) ergab läsional eine geringere Zelldichte der BrdU⁺/NG2⁺-Zellen bei TIMP-3^{-/-}-Mäusen (26; Standardabweichung: 0,9) im Vergleich zu WT-Tieren (28; Standardabweichung: 1,4).

Ähnliche Relationen konnten auch periläsional nachgewiesen werden. Es zeigte sich periläsional eine geringere Zelldichte der BrdU⁺/NG2⁺-Zellen bei TIMP-3^{-/-}-Mäusen (52; Standardabweichung: 1,4) im Vergleich zu den WT-Tieren (97; Standardabweichung: 2,8).

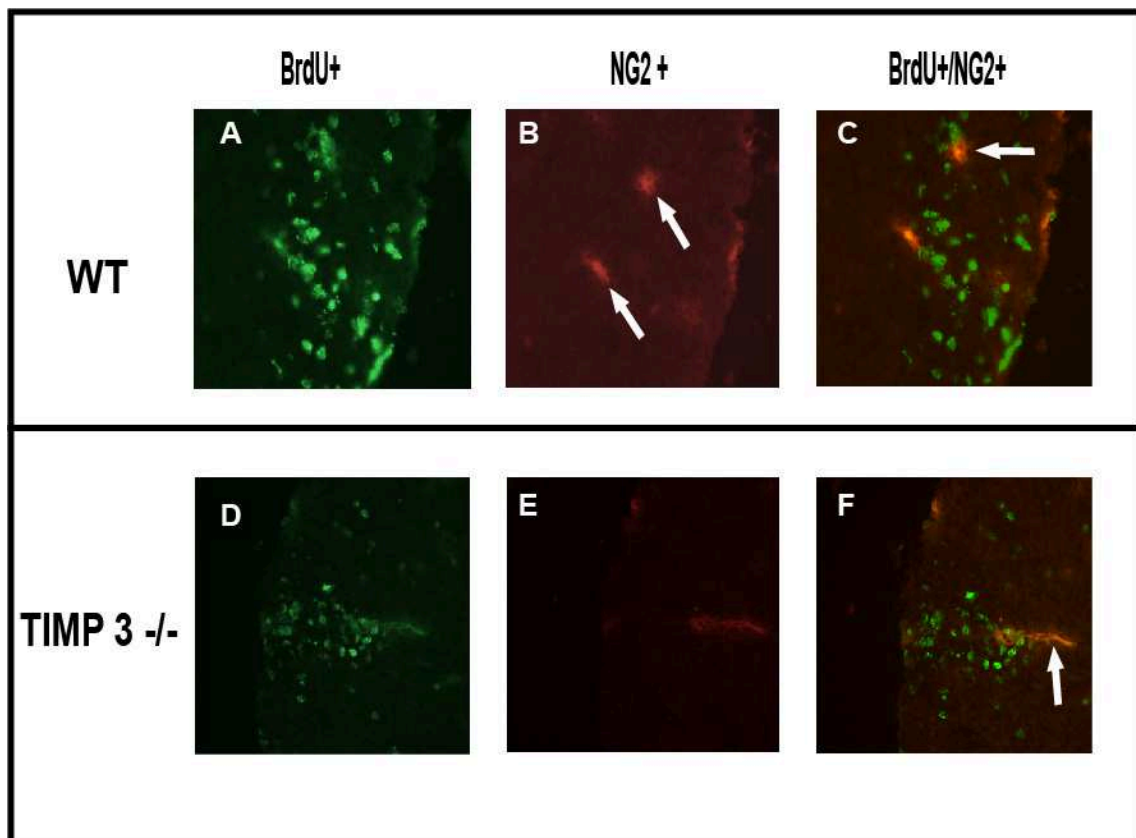


Abb. 19: Doppelimmunfluoreszenz-Färbung von BrdU und NG2 im Rückenmark-Bereich von TIMP-3^{-/-} und Wildtyp-Mäusen. A: Entzündliches Infiltrat mit zahlreichen BrdU-positiven Lymphozyten. B: NG2-positive oligodendrogliale Progenitoren im Bereich des entzündlichen Infiltrates (mit weißen Pfeilen markiert). C: Entzündliches Infiltrat mit Darstellung von BrdU/NG2-positiven Zellen, die proliferierenden oligodendroglialen Progenitoren entsprechen (Overlay-Technik, ImageJ). D: Perivaskuläres entzündliches Infiltrat mit zahlreichen BrdU-positiven Zellen, die zum Großteil proliferierenden Lymphozyten entsprechen. E: Ein mit Anti-NG2 angefärbtes Gefäß im Bereich der entzündlichen Läsion. Kein Nachweis von oligodendroglialen Progenitoren. F: Der Pfeil zeigt das NG2-positive Gefäß im Bereich des perivaskulären entzündlichen, grüngefärbten Infiltrats ohne Nachweis von oligodendroglialen Progenitoren(Overlay-Technik, ImageJ).

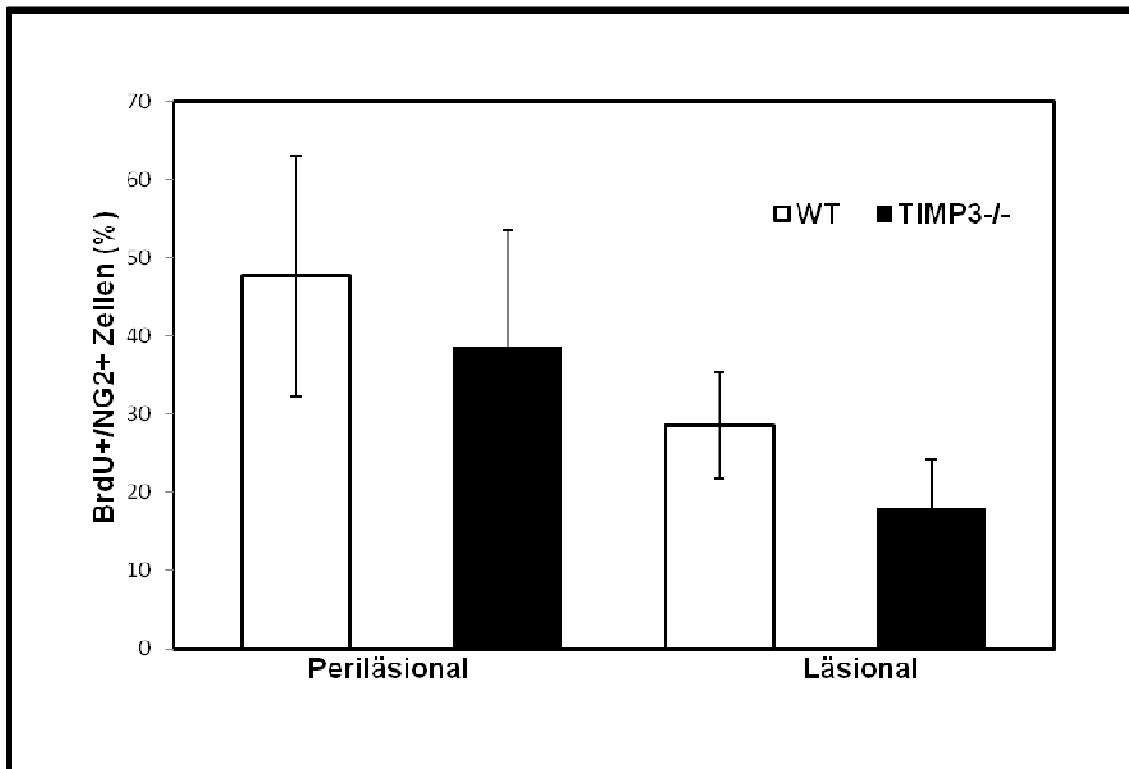


Abb. 20: Die Grafik zeigt die Zelldichte der BrdU/NG2-positiven oligodendroglialen, proliferierenden Progenitoren prozentual in Bezug auf die Gesamtpopulation proliferierender Zellen (BrdU⁺) in Abhängigkeit von der Lokalisation in der weißen Substanz des Rückenmarks. Der Fehlerindikator der Mittelwerte entspricht der Standardabweichung (nWT = 5; nTIMP-3^{-/-} = 5).

4.5 Molekularbiologische Untersuchungen auf mRNA-Ebene

4.5.1 TIMP-3-Expression auf mRNA-Ebene

Übereinstimmend mit DNA-PCR-Untersuchungen fehlte den als TIMP-3^{-/-} genotypisierten Tieren die TIMP-3-Bande, die eine TIMP-3-Expression auf mRNA-Ebene aufweist (siehe Abb. 21).

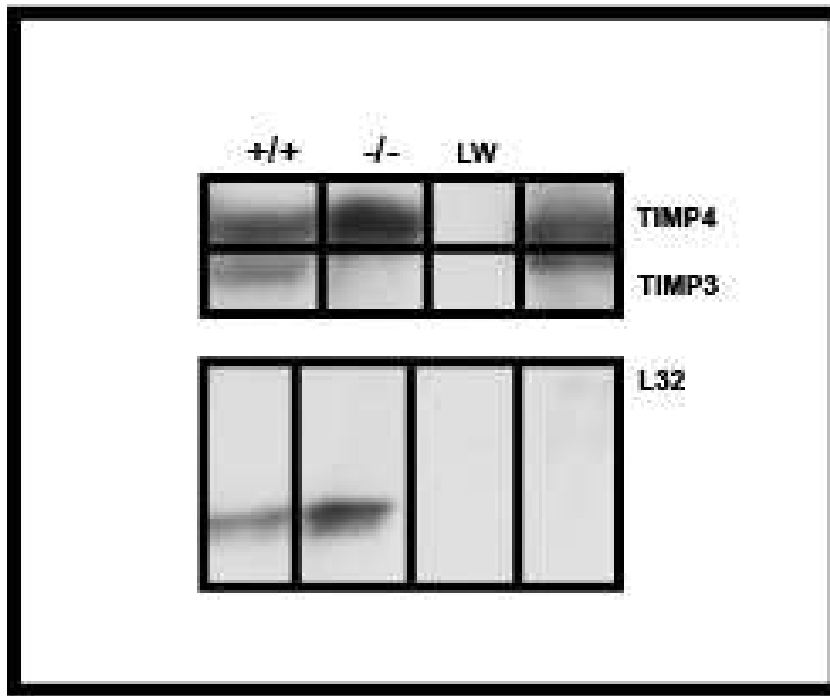


Abb. 21: Nachweis des TIMP-3^{-/-}-Genotyps auf RNA-Ebene mittels RPA (RNA protection assay) mit Proben aus dem Rückenmark. Wildtyp-Tiere (WT) zeigten eine Bande, die auf eine mRNA-TIMP-3-Expression schließen lässt. TIMP-3^{-/-}-Tiere zeigen keine Bande, deren Molekulargewicht einer mRNA-TIMP-3-Expression entspricht. LW = Leerwert. Die untersten Banden mit dem geringsten Molekulargewicht zeigen die mRNA-Expression des konstitutiv exprimierten ribosomalen Proteins L32 an.

4.5.2 ADAM-10- und ADAM-17-Expression auf mRNA-Ebene

Für die folgenden mRNA-Untersuchungen wurde jeweils die RNA aus dem Rückenmark von WT- und TIMP-3^{-/-}-Mäusen isoliert. Mithilfe des ImageJ-Programms wurde eine quantitative Auswertung der ADAM-Expression auf mRNA-Ebene erstellt. Die verwendete AP14-Sonde zeigte eine höhere Expression von ADAM-10 und ADAM-17 bei TIMP-3^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu WT-Mäusen. Die Untersuchung erfolgte 20 Tage nach EAE-Induktion(siehe Abb. 22).

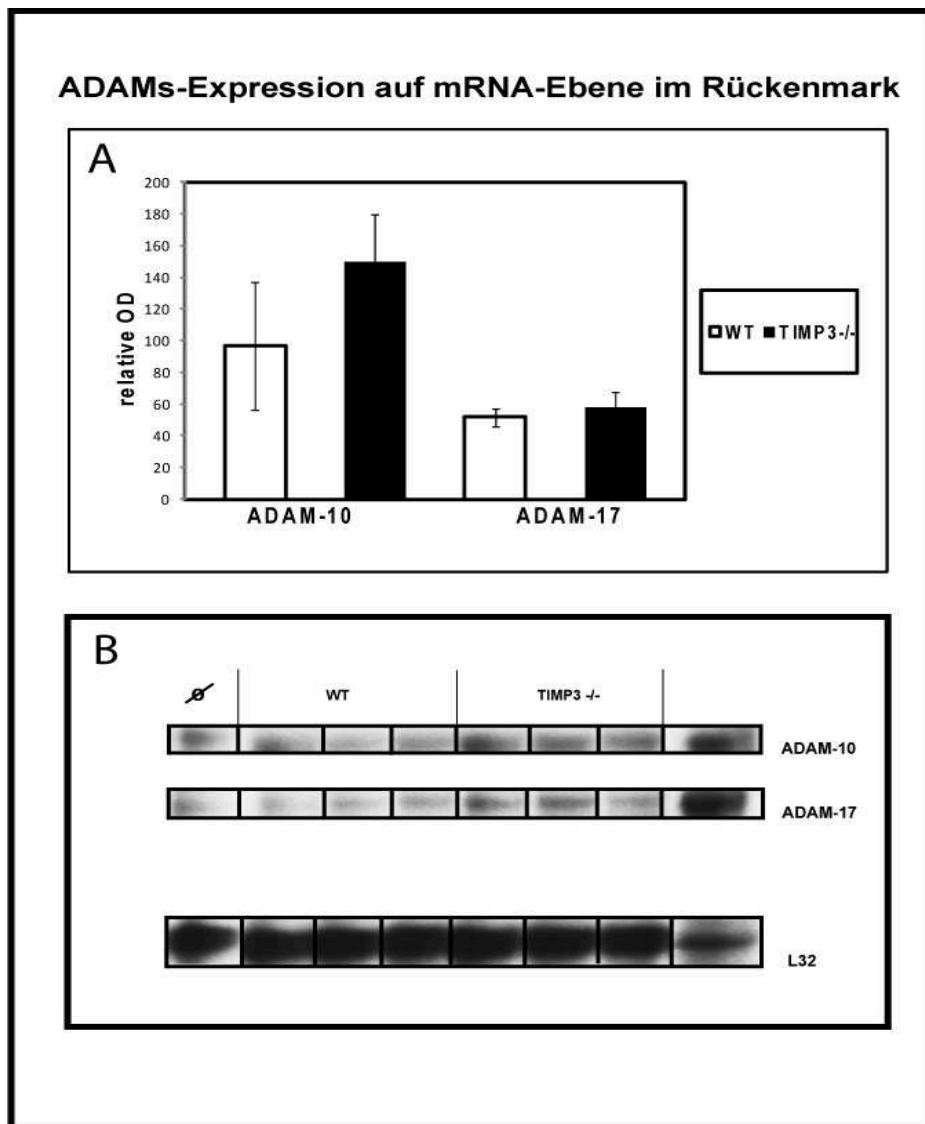


Abb. 22: A: Die Grafik zeigt die quantitative Auswertung der relativen mRNA-Expression für ADAM-10 und ADAM-17 in WT- und TIMP3^{-/-}-Mäusen. Die Mittelwerte und Standardabweichungen sind angegeben. B: Das Autoradiogramm zeigt grau-schwarz angefärbte Banden als Zeichen der mRNA-Expression. Die optische Dichte der Banden ermöglicht eine quantitative Evaluation der mRNA-Expression. Die untersten Banden mit dem geringsten Molekulargewicht zeigen die mRNA-Expression des konstitutiv exprimierten ribosomalen Proteins L32. $\text{Relative OD} = (\text{OD}_{\text{Bande}} - \text{HG}_{\text{Bande}}) / (\text{OD}_{\text{L32}} - \text{HG}_{\text{L32}})$. HG = Hintergrund. Als Kontrolle (markiert mit ∞) wurde eine WT-Maus ohne EAE eingesetzt.

4.5.3 Caspase-3-Expression auf mRNA-Ebene

Im frühen Stadium der EAE (20 Tage nach EAE-Induktion) zeigten die beiden untersuchten Tierlinien keine relevanten Unterschiede in der Caspase-3-Expression. Im

späteren Stadium der EAE (40 Tage nach EAE-Induktion) wiesen die TIMP-3^{-/-}-Mäusen eine Caspase-3-Überexpression auf(siehe Abb. 23).

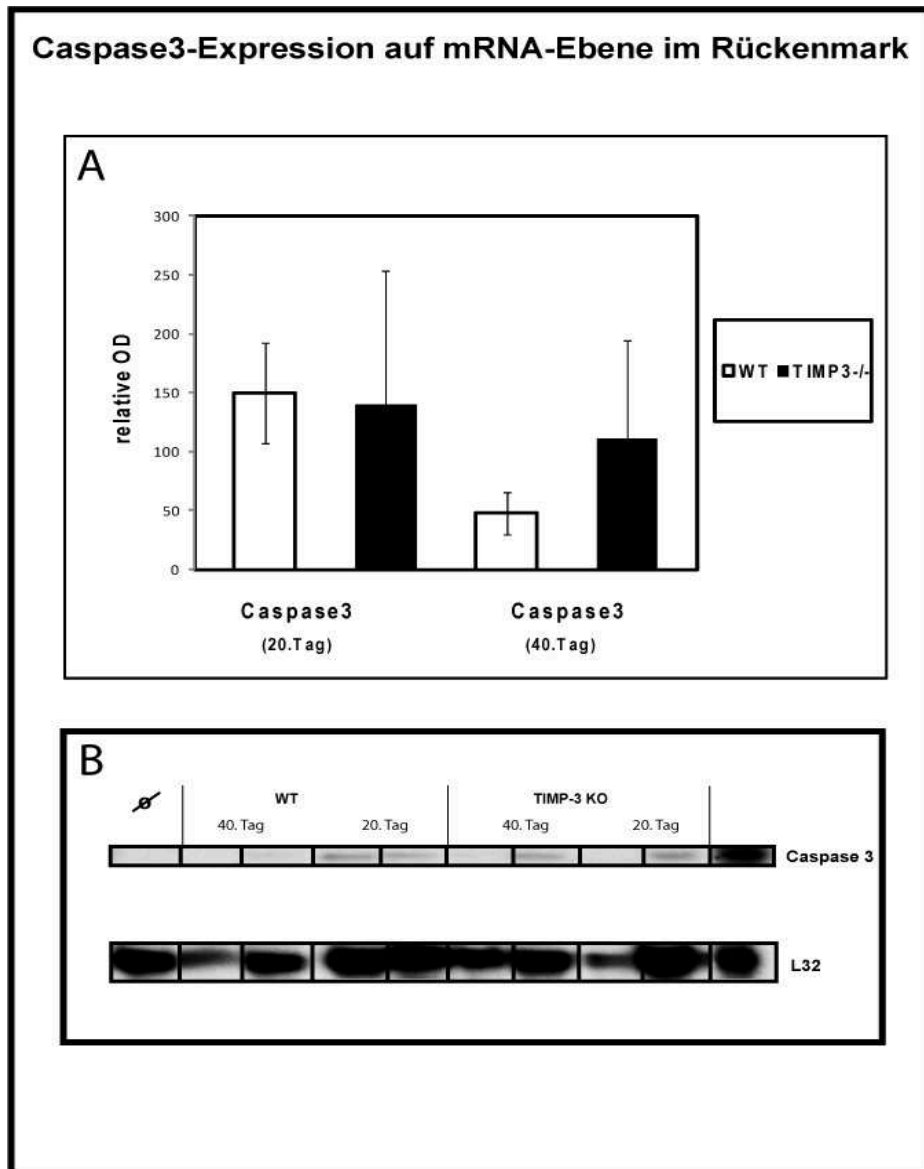


Abb. 23: A: Die Grafik zeigt die quantitative Auswertung (ImageJ) der mRNA-Expression für Caspase-3, deren Ausmaß mit relativer OD markiert ist. Die Messungen erfolgten 20 und 40 Tage nach EAE-Induktion. Der Fehlerindikator der Mittelwerte entspricht jeweils der Standardabweichung. B: Das Radiogramm zeigte grau-schwarz angefärbte Banden als Zeichen der mRNA-Expression. Die optische Dichte der Banden ermöglicht eine quantitative Evaluation der mRNA-Expression. Die untersten Banden mit dem geringsten Molekulargewicht zeigen die mRNA-Expression des konstitutiv exprimierten ribosomalen Proteins L32.
$$\text{Relative OD} = (\text{OD}_{\text{Bande}} - \text{HG}_{\text{Bande}}) / (\text{OD}_{\text{L32}} - \text{HG}_{\text{L32}})$$
. HG = Hintergrund. Als Kontrolle (markiert mit ∞) wurde eine WT-Maus ohne EAE eingesetzt.

4.6 Analyse der TNF-Expression auf Proteinebene

Da bei TIMP-3^{-/-}-Mäusen die Inhibition der ADAM-17-Aktivität entfällt, ist im Rahmen einer hohen ADAM-17-Expression mit einer hohen Expression der löslichen TNF-Form zu rechnen. Daher wurde zur Analyse der Auswirkung der ADAM-17-Expression auf Proteinebene die TNF-Expression (ELISA-TNF-Kit, PeproTech) im Rückenmark exploriert. Die Messungen wurden 20 und 40 Tage nach EAE-Induktion durchgeführt. Die TIMP-3^{-/-}-Tiere wiesen zu beiden Zeitpunkten erhöhte Konzentrationen der löslichen TNF-Form im Vergleich zu den WT-Tieren auf. Parallel konnten zu beiden Zeitpunkten reduzierte Konzentrationen der membranösen TNF-Form bei den TIMP-3^{-/-}-Mäusen nachgewiesen werden (siehe Abb. 24).

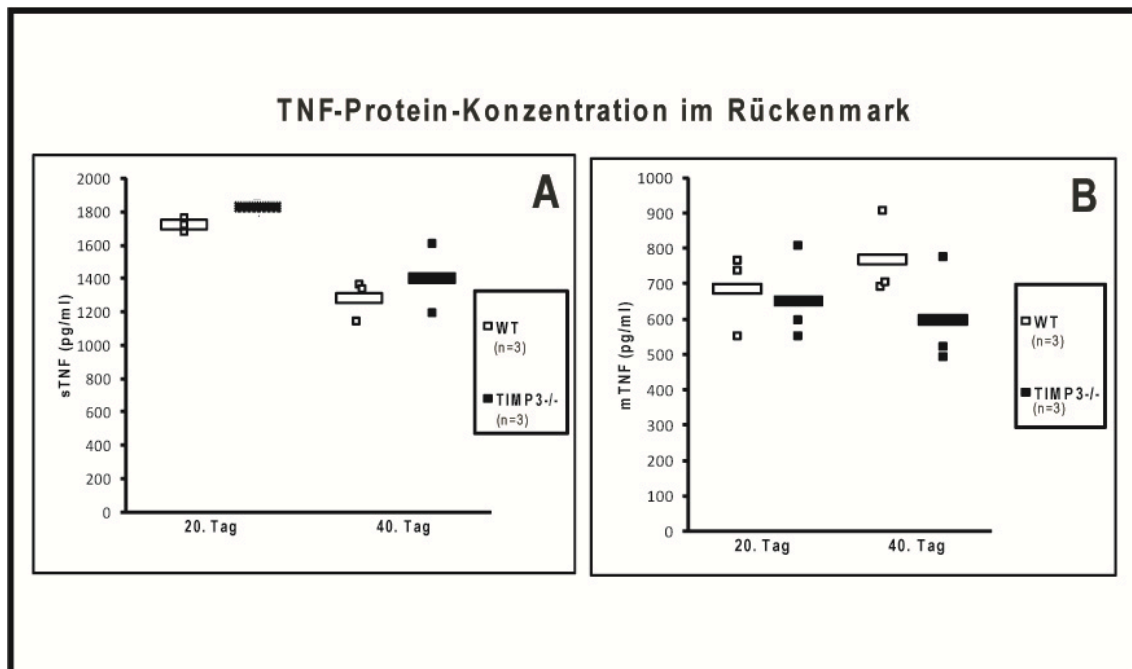


Abb. 24: Diagramm A zeigt die lösliche TNF(sTNF)-Konzentration im Rückenmark. Hier ist sowohl 20 als auch 40 Tage nach EAE-Induktion eine erhöhte Konzentration bei den TIMP-3^{-/-}-Mäusen im Vergleich zu den WT-Tieren zu erkennen. Diagramm B stellt die spinale Konzentration der membranösen TNF(mTNF)-Form dar. Hier sind höhere Konzentrationen bei den WT-Mäusen zu erkennen. Die untere Nachweisgrenze des TNF-ELISA-Kits lag bei 32 pg/ml. Die Mittelwerte werden durch horizontale Balken angezeigt.

Insbesondere ist der Unterschied zu den WT-Mäusen im späteren Stadium der Remission (40 Tage nach EAE-Induktion) zu erkennen. Hervorzuheben ist, dass die lösliche TNF-Form im früheren Stadium der EAE (um den 20. Tag nach der Induktion)

eine dominante Rolle spielt, was gut mit vergleichbaren histologischen Befunden der beiden Tierlinien korrespondiert. Im späteren Stadium der EAE zeigten die TIMP-3^{-/-}-Mäuse geringere Konzentrationen der membranösen TNF-Form, die remyelinisierende Prozesse stimuliert.

Parallel zur TNF-Bestimmung im Rückenmark wurden die TNF-Konzentrationen im Serum untersucht. Diese lagen allerdings überwiegend unterhalb der Nachweisgrenze des ELISA-TNF-Kits, sodass keine Beurteilung der untersuchten Tiere möglich war.

5. Diskussion

5.1 Auswirkungen des TIMP-3 auf den klinischen Verlauf der EAE

Die ersten Experimente einer aktiven EAE-Induktion mit der Gabe von 500 ng Pertussis-Toxin (PTX) waren mit internistischen Komplikationen assoziiert. Ein großer Teil der TIMP-3^{-/-}-Tiere verstarb ca. 16 Tage nach der EAE-Induktion. Als letale Komplikation ist unter der Berücksichtigung der Befundkonstellation ein Multiorganversagen mit begleitendem „Zytokin-Schock“ zu favorisieren. In der Literatur wurde bereits eine TNF-vermittelte erhöhte Mortalität der TIMP-3^{-/-}-Mäuse nach Liposaccharid- (LPS-)Applikation beschrieben (Smookler et al., 2006), wobei in dieser Arbeit eine deutlich kürzere Latenzzeit (ab dem 2. Tag) der Mortalität genannt wurde. Da sowohl LPS als auch PTX eine immunstimulierende Wirkung aufweisen (Carswell et al., 1975; Smookler et al., 2006), ist hier ursächlich eine entgleiste immunologische Reaktion mit einem Zytokin-Schock nach der hochdosierten PTX-Gabe bei den TIMP-3^{-/-}-Tieren gut vorstellbar, wobei in der Literatur nur bei LPS-Applikation eine direkte TNF-Aufregulierung beschrieben wurde (Carswell et al., 1975; Smookler et al., 2006).

Differentialdiagnostisch sind andere Ursachen der erhöhten Mortalität der TIMP-3^{-/-}-Mäuse kritisch in Erwägung zu ziehen, z.B. eine Kontamination bei den s.c. und i.p. Injektionen. Da die Tiere erst etwa am 16. Tag nach erfolgter EAE-Induktion verstarben, erscheint allerdings eine injektionsbedingte Kontamination mit konsekutiver Peritonitis und Sepsis als unwahrscheinlich. In diesem Fall wäre mit einem fulminanten letalen Verlauf zu rechnen gewesen, der mit kürzerer Latenz nach erfolgter Injektion eintreten sollte. Der letale Verlauf wurde möglicherweise additiv von der in der

Literatur beschriebenen konstitutiv auftretenden Pathologie der inneren Organe, wie Peribronchitiden, dilatative Kardiomyopathie oder entzündliche Leberveränderungen, bei TIMP-3^{-/-}-Tieren begünstigt (Fedak et al., 2004; Gill et al., 2010; Gill et al., 2009; Leco et al., 2001; Macgregor et al., 2009; Mohammed et al., 2004). Hier ist allerdings hervorzuheben, dass in den meisten dieser Arbeiten ältere TIMP-3^{-/-}-Mäuse (12–18 Monate alt) analysiert wurden. Somit sind die Interpretation und die Übertragbarkeit diesen Daten auf unser TIMP-3^{-/-}-Modell nur eingeschränkt möglich. Lediglich in der Arbeit von Gill und Mitarbeitern (Gill et al., 2010) wurde auch bei jüngeren TIMP-3^{-/-}-Mäusen (8 Wochen alt) eine gestörte Lungenfunktion mit protrahierter pulmonaler Infektion nach Bleomycin-Applikation beobachtet. Somit ist es nicht auszuschließen, dass auch die jüngeren TIMP-3^{-/-}-Tiere (2–4 Monate alt) die o.g. Pathologien der inneren Organe entwickeln können. Daher sollten die Ergebnisse von Arbeiten mit TIMP-3^{-/-}-Mäusen verschiedener Altersstufen abgewartet werden, die konstitutiv auftretende pathologische Veränderungen sowie Modifikationen pathologischer Prozesse betrachten.

In der Arbeit von Smookler und Mitarbeitern wurden LPS-Dosis-abhängige Effekte auf die Mortalitätsrate von TIMP-3^{-/-}-Mäusen beobachtet (Smookler et al., 2006), sodass wir analog die applizierte PTX-Dosis von 500 ng auf 100 ng pro Maus reduzierten. Diese Maßnahme führte zu einer deutlichen Reduktion der Mortalität (von 36% auf 5%), sodass hier analog zur LPS-Auswirkung (Smookler et al., 2006) der Pathomechanismus einer entgleisten immunologischen Antwort bei Gabe der höheren PTX-Dosis vorstellbar ist.

Unter Berücksichtigung des TIMP-3-Funktionsprofils und der aktuellen Literatur wurde primär mit einem dynamischeren und fulminanteren EAE-Verlauf bei den TIMP-3^{-/-}-Tieren gerechnet. Dafür sprach die gesteigerte Permeabilität der Blut-Hirn-Schranke bei fehlender MMP-3-Inhibition in den TIMP-3^{-/-}-Mäusen sowie eine ADAM-17-vermittelte Hochregulation von löslichem proinflammatorischem TNF (Gurney et al., 2006; Walker and Rosenberg, 2009). Diese MMP-3-Hochregulierung könnte zu einer vermehrten ZNS-Invasion aktivierter Lymphozyten führen, sodass theoretisch eine rasch einsetzende und fulminant verlaufende EAE-Klinik zu erwarten wäre. Diese Hypothese ließ sich allerdings in diesem Projekt nicht erhärten. Im akuten Stadium der aktiven EAE mit 100 ng PTX (erster klinischer Gipfel der Krankheit) zeigten sich keine signifikante Unterschiede zwischen den TIMP-3^{-/-}- und den WT-Mäusen bezüglich der

maximalen sowie der mittleren Krankheitsschwere. Da nach unserer Erkenntnis bis dato in der Literatur keine EAE-Experimente mit TIMP-3^{-/-}-Tieren publiziert worden sind, ist eine Vergleichsanalyse des klinischen Verlaufs nicht möglich. Da sowohl im Rahmen der aktiven als auch der passiven EAE vergleichbare Klinikkonstellationen bei TIMP-3^{-/-}- und WT-Tieren reproduziert werden konnten, ist anzunehmen, dass die Auswirkungen von TIMP-3 auf den EAE-Verlauf unabhängig von der Art einer aktiven bzw. passiven EAE-Induktion sind. Im späteren Stadium (40. Tag) der EAE zeigten die TIMP-3^{-/-}-Tiere eine statistisch signifikant höhere Krankheitsschwere (*p<0,05). Die weiblichen TIMP-3^{-/-}-Tiere zeigten eine diskret höhere Krankheitsschwere als die männlichen TIMP-3^{-/-}-Tiere 40 Tagen nach EAE-Induktion. Diese Konstellation ist kongruent mit der aktuellen Literatur (Kuhlmann et al., 2009; Spach and Hayes, 2005; Teuscher et al., 2004), die mehr ausgeprägte Klinik bei weiblichen Mäusen beschreibt. 20 Tage nach EAE-Induktion konnte diese Geschlechtskorrelation nicht beobachtet werden. Insgesamt konnte kein signifikanter Unterschied zwischen den Geschlechtern der beiden untersuchten Tierlinien nachgewiesen werden. Außerdem ist zu konstatieren, dass die statistisch signifikanten Unterschiede (*p<0,05) der klinischen Remission im späteren EAE-Stadium (40. Tag) als Zeichen gestörter regenerativer Prozesse bei TIMP-3^{-/-}-Tieren zu interpretieren ist. Diese Konstellation lässt darauf schließen, dass nicht das Ausmaß der ZNS-Entzündung, sondern die Einschränkung regenerativer Prozesse (Remyelinisierung) bei TIMP-3^{-/-}-Tieren ausschlaggebend für die gestörte Remission der EAE-Klinik ist.

Ein weiterer wichtiger Punkt ist die Betrachtung möglicher einschränkender Faktoren, welche die Beurteilung von motorischen Defiziten bei TIMP-3^{-/-}-Mäusen beeinflussen können. Hier ist neben konstitutiv auftretenden Arthritiden (Sahebjam et al., 2007) mit möglichen konsekutiv veränderten Bewegungsmustern bei jungen TIMP-3^{-/-}-Mäusen (Alter: ab 4. Woche) ein gestörter Aufbau des (Gill et al., 2009) Bronchialbaums zu nennen. Letzterer kann im Rahmen einer Hypoxie die Psychomotorik beeinflussen, die wiederum die subjektive Beurteilung der klinischen Krankheitsschwere klinisch-neurologisch beeinflussen kann. Zum anderen ist im Hinblick auf die Arbeit von Baba und Mitarbeitern bei TIMP-3^{-/-}-Mäusen (3 Monate alt) mit kognitiven Veränderungen zu rechnen (Baba et al., 2009a), die sich sowohl auf die Psychomotorik als auch möglicherweise auf die Praxis auswirken können. Somit ist vorstellbar, dass die kompensatorischen Fähigkeiten für die EAE-Symptomatik der TIMP-3^{-/-}-Tiere reduziert waren.

Insgesamt lässt sich konkludieren, dass TIMP-3^{-/-}-Mäuse im Rahmen einer aktiven oder passiven EAE eine eingeschränkte Remission der Krankheitsschwere aufweisen. Die Konstellation der unterschiedlichen EAE-Verläufe ohne abgrenzbare erneute Schübe der beiden untersuchten Mauslinien lässt pathomechanisch eine Störung regenerativer, remyelinisierender Prozesse favorisieren. Hinweise auf erneute floride ZNS-entzündliche Exazerbationen der TIMP-3^{-/-}-Tierlinie lagen nicht vor.

5.2 TIMP-3-Expression und histomorphologische ZNS-Veränderungen

Im Hinblick auf die histologische Ausprägung der entzündlichen Infiltrate konnten sowohl im Frühstadium (20. Tag) als auch im späteren Stadium der EAE (40. Tag) keine relevanten Unterschiede zwischen TIMP-3^{-/-}- und WT-Tieren nachgewiesen werden. Hervorzuheben ist, dass im späteren Stadium keine Hinweise auf eine floride entzündliche Reaktion in den beiden untersuchten Tierlinien (nWT = 13; nTIMP-3^{-/-} = 13) mehr vorlagen. Diese Konstellation spiegelte allerdings nicht die unterschiedlichen klinischen Schweregrade von TIMP-3^{-/-}- und WT-Mäusen wider. Um der Frage eines morphologischen Korrelates dieser Unterschiede in der Klinik nachzugehen, wurden die spinalen demyelinisierten Herde beider Tiergruppen analysiert. Während bei WT-Mäusen im Spätstadium der EAE (40. Tag) zwar Areale mit einer reduzierten Dichte der myelinisierten Axone gefunden wurden, wiesen TIMP-3^{-/-}-Tiere in Semidünnschnitten persistierende demyelinisierte Herde mit einem nahezu kompletten Verlust der myelinisierten Axone auf (nWT = 4; nTIMP-3^{-/-} = 4). Demnach ist anzunehmen, dass die fehlende Remyelinisierung bei den TIMP-3^{-/-}-Tieren zu der persistierenden EAE-Symptomatik führte. Einschränkend für diese Aussage ist allerdings die geringe Anzahl der untersuchten Tiere (nWT = 4; nTIMP-3^{-/-} = 4), die für die Semidünnschnitte eingesetzt wurden. Außerdem ist die fehlende Quantifizierung der geringeren Dichte der markhaltigen Axone als Kritikpunkt anzumerken.

Diese Ergebnisse korrespondieren mit bereits publizierten Untersuchungen selektiver Inhibitoren der löslichen und der membranösen TNF-Form (Brambilla et al., 2011; Taoufik et al., 2011), die eine beeinträchtigte TNF-vermittelte spinale Remyelinisierung zeigten. Diese Arbeiten entsprechen der Pathomechanik der hier dargestellten Daten an TIMP-3^{-/-}-Mäusen.

Der Proliferationsassay von oligodendroglialen Progenitoren (OPC)(Dawson et al., 2000; Horner et al., 2000; Larsen et al., 2003; Polito and Reynolds, 2005; Rasmussen et

al., 2011; Scolding et al., 1998) ergab eine reduzierte Zelldichte proliferierender oligodendroglialer Progenitoren im Rückenmark der TIMP-3^{-/-}-Tiere. Dies impliziert eine beeinträchtigte Remyelinisierung läsional und periläsional, die aufgrund der reduzierten Dichte von Effektor-Zellen nicht bewerkstelligt werden kann. Als methodisches Problem zeigte sich eine stellenweise schwierige und nicht definitiv eindeutige morphologische Zuordnung von proliferierenden NG2⁺-Zellen, da der NG2-Antikörper neben oligodendroglialen Progenitoren auch Gefäße markierte. Letztere wiesen stellenweise proliferationsaktives und BrdU-angefärbtes Endothel auf, sodass bei gleichzeitiger lokaler NG2-Immunfluoreszenz eine definitive Differenzierung der proliferierenden oligodendroglialen Progenitoren problematisch war. Im Hinblick auf die Ergebnisse der verwendeten Quantifizierungsmethode (prozentuale Quantifizierung BrdU⁺/NG2⁺) wurden läsional vergleichbare Werte wie in der Arbeit von Rasmussen und Mitarbeitern (Rasmussen et al., 2011) erzielt, wobei periläsional der prozentuale Anteil von BrdU⁺/NG2⁺-Zellen im TIMP-3^{-/-}-Modell deutlich höher lag. Hervorzuheben ist, dass in der Untersuchung von Rasmussen und Mitarbeitern eine subventrikuläre Zone des Großhirns in Nachbarschaft einer entzündlichen Läsion quantifiziert wurde. Ferner wurde in der Untersuchung von Rasmussen und Mitarbeitern der prozentuale Anteil von BrdU⁺/NG2⁺-Zellen an der Gesamtpopulation der NG2⁺-Zellen bestimmt, sodass insgesamt die Interpretation und der Vergleich der Ergebnisse nur eingeschränkt möglich sind.

Der Arbeit von Brambilla und Mitarbeitern (Brambilla et al., 2011) ist zu entnehmen, dass die selektive Inhibition der löslichen TNF-Form mit XPro1595 im Rückenmark zu einer signifikanten Zunahme der Zelldichte von oligodendroglialen Progenitoren ($p^* < 0,05$) führt. Die Applikation des XPro1595-Inhibitors spiegelte sich auch in dem milderen klinischen Verlauf wider. Interessanterweise ergab diese Studie, dass die Gabe eines unselektiven TNF-Blockers (Etanercept) keine protektive Auswirkung auf den EAE-Verlauf zeigte (Brambilla et al., 2011). In Übereinstimmung mit den Literaturdaten ist zu konstatieren, dass die Zellzahl oligodendroglialer Progenitoren mit einer effizienten Remission der EAE-Klinik korrespondiert.

5.3 TIMP-3-Defizienz führt zur Aufregulierung von ADAM-10- und ADAM-17-mRNA

Die molekularbiologischen Untersuchungen physiologischer TIMP-3-gesteuerter Moleküle ergaben im Rückenmark der TIMP-3^{-/-}-Mäuse neben einer Hochregulierung

von ADAM-10- und ADAM-17-mRNA 20 Tage nach EAE-Induktion auch eine Hochregulierung von Caspase-3-mRNA 40 Tage nach der Induktion. Diese Daten decken sich teilweise mit den bereits publizierten Untersuchungen, die eine Hochregulation von ADAM-17-mRNA und von ADAM-17 auf Proteinebene in der Remissionsphase der EAE im Rückenmark der Lewis-Ratte zeigten (Plumb et al., 2005). Somit ist zu konkludieren, dass im EAE-Modell für TIMP-3^{-/-}-Mäuse eine Hochregulation von aktivem ADAM-17-Protein vorliegt. Dafür spricht das spinale Konzentrationsverhältnis von löslichem und membranösem TNF bei TIMP^{-/-}-Mäusen, das im ELISA bestimmt wurde. Um diese Schlussfolgerung definitiv zu überprüfen, müssten ELISA- bzw. Western-Blot-Untersuchungen für ADAM-17 unternommen werden.

Die nachgewiesene Aufregulierung der ADAM-10-mRNA im TIMP-3^{-/-}-EAE-Modell lässt postulieren, dass möglicherweise auch auf der Proteinebene eine Hochregulierung von ADAM-10 vorliegt. ADAM-10 spielt eine wichtige Rolle in chronisch-entzündlichen ZNS-Prozessen, indem der IL-6-Rezeptor hochreguliert wird (Rose-John et al., 2006). Die Frage, ob dieser Mechanismus auch im TIMP-3^{-/-}-EAE-Modell greift, lässt sich hier nicht beantworten, da in diesem Projekt ADAM-10 und der IL-6 Rezeptor nicht auf Proteinebene untersucht wurden. Die Hochregulation von Caspase-3 auf mRNA-Ebene im Spätstadium impliziert eine gesteigerte Apoptoserate. Hier ist mechanistisch gut vorstellbar, dass unter anderem untergehende Oligodendrozyten dazu beitragen. Einschränkend muss allerdings die Tatsache angeführt werden, dass auch die untergehenden entzündlichen Zellen diesen Befund relevant beeinflussen und zu Fehlinterpretation führen können. Insgesamt erlauben die RNA-Untersuchungen in diesem Projekt nur eingeschränkt und lediglich indirekt die Implikationen des Signalwegs TIMP-3/ADAM-17/TNF/TNFR1 und TNFR2 (siehe Abb. 25) zu evaluieren. Die RNA-Untersuchungen erlauben die Schlussfolgerung, dass das fehlende TIMP-3 im EAE-Modell zur Hochregulation von ADAM-10 und ADAM-17 auf mRNA-Ebene führt. Dies begünstigt möglicherweise die TNF-vermittelte Apoptose von Oligodendrozyten. Dafür spricht auch die spinale Aufregulation von Caspase-3 im Rückenmark von TIMP-3^{-/-}-Mäusen 40 Tage nach EAE-Induktion.

5.4 „Zwei Gesichter“ von TNF im EAE-Modell

Um die mRNA-Untersuchungen auf Proteinebene zu evaluieren, wurde das TNF-Protein als Effektor einer hohen ADAM-17-Expression bei TIMP-3^{-/-}-Tieren analysiert.

Die ELISA-Untersuchungen ergaben unterschiedliche TNF-Konzentrationen im Rückenmark der untersuchten Tiere. Sowohl im Frühstadium als auch im Spätstadium der EAE konnten erhöhte Konzentrationen der löslichen TNF-Form bei TIMP-3^{-/-}-Mäusen detektiert werden, was gut mit der auf RNA-Ebene gezeigten Hochregulierung von ADAM-17 korrespondiert. Gleichzeitig wiesen die TIMP-3^{-/-}-Tiere geringere Konzentrationen der membranösen TNF-Form auf, welche die Proliferation oligodendroglialer Progenitoren stimuliert. Dieses ist mechanistisch kongruent mit dem Befund des Proliferationsassays für OPC, der eine reduzierte Progenitoren-Dichte bei den TIMP-3^{-/-}-Mäusen anzeigte. Einschränkend für die ELISA-Analyse waren allerdings einerseits die geringen Tierzahlen pro untersuchter Gruppe (nWT = 3; nTIMP-3^{-/-} = 3), andererseits wiesen einige Messergebnisse eine hohe Standardabweichung auf. Letztere ist teils auf Unterschiede in der Krankheitsschwere in den untersuchten Tiergruppen, teils auf Messfehler zurückzuführen.

Die unterschiedlichen Konzentrationen der löslichen und der membranösen TNF-Form spiegeln sich im differentiellen klinischen EAE-Verlauf bei TIMP-3^{-/-}- und WT-Tieren wider. Diese Ergebnisse sind kongruent mit der aktuellen Literatur (Arnett et al., 2001; Jurewicz et al., 2005; McCoy and Tansey, 2008; Nomura et al., 2011; Selmaj et al., 1991a; Selmaj et al., 1991b; Taoufik et al., 2011), in der dem TNF-Protein eine duale und antagonistische Wirkung auf den EAE-Verlauf nachgewiesen wird. Ältere Arbeiten (Selmaj et al., 1991a; Selmaj et al., 1991b) postulierten, dass TNF als proinflammatorisches und proapoptotisches Zytokin lediglich einen die EAE verschlimmernden Charakter aufweist. Erst in den letzten Jahren konnte „das zweite, nun positive Gesicht“ des TNF gezeigt werden, der über die TNF-vermittelte TNFR2-Aktivierung die oligodendroglialen Progenitoren zu Proliferation und konsekutiver Remyelinisierung im ZNS stimuliert (Arnett et al., 2001; Caminero et al., 2011).

5.5 Effiziente Remyelinisierung als Korrelat der klinischen EAE-Remission

Um eine effiziente Remyelinisierung zu bewerkstelligen, ist neben intakten Oligodendrozyten auch eine Induktion remyelinisierender Prozesse nötig. Um eine Remyelinisierung zu fördern, darf zum einen die Oligodendrozytenzahl nicht im Rahmen einer Apoptose bzw. einer Inflammation reduziert werden. Zum anderen müssen Mechanismen vorliegen, die eine lokale Oligodendrozyten-Proliferation stimulieren können. Ferner ist zu untersuchen, warum eine bereits eingeleitete Remyelinisierung unter bestimmten Umständen wieder abgebrochen wird. Infolgedessen entstehen

sogenannte „shadow plaque areas“ (Bramow et al., 2010; Patrikios et al., 2006) bei MS-Patienten mit inkomplett abgelaufener Remyelinisierung, die zur Persistenz der fokalen neurologischen Ausfälle führen können.

Durch die ADAM-17-Inhibition verhindert das TIMP-3-Protein die TNF-Abspaltung von Mikroglia/Makrophagen, was zur Proliferation von oligodendroglial differenzierten Progenitoren führt. Mäuse mit einer TNFR2-Defizienz zeigen eine verschlechterte Remyelinisierung und Remission der EAE-Klinik (Arnett et al., 2001); dieser Rezeptor ist normalerweise im Bereich demyelinisierter Herde hochreguliert (Arnett et al., 2001). Es steht seit Jahren im Fokus des Interesses, einen Marker für eine gerade stattfindende, effiziente Remyelinisierung zu finden. Hier sind einerseits die charakteristischen Marker für oligodendrogliale Zellenlinien zu nennen: membranöses Proteoglykan (NG2) (Dawson et al., 2000; Polito and Reynolds, 2005), der Transkriptionsfaktor Olig-1 (Scoling et al., 1998), der Platelet-Derived Growth Factor α Rezeptor (PDGFR) (Maeda et al., 2001; Vana et al., 2007) sowie die zyklische Nukleotid-Phosphodiesterase (CNPase) (Baarink et al., 2009; Polito and Reynolds, 2005). Andererseits sind auch die regulierenden Faktoren von Interesse, welche die Differenzierung von Progenitoren zu reifen Oligodendrozyten steuern. Der Fibroblast Growth Factor (FGF) inhibiert zum Beispiel die Differenzierung von oligodendroglialen Progenitoren, woraufhin keine effiziente Remyelinisierung mehr stattfinden kann (Zhou et al., 2006). Auch der Insulin Growth Factor 1 (IGF1) wirkt limitierend auf die Reifung von OPC (Mason et al., 2003).

Das TIMP-3-Protein in der EAE kann einerseits über die ADAM-17-Inhibition eine apoptotische Kaskade der Oligodendrozyten inhibieren und andererseits parallel über den mTNF/TNFR2-Signalweg eine OPC-Proliferation stimulieren. Diese zwei Signalwege können bei TIMP-3^{-/-}-Tieren zu einer eingeschränkten Regredienz der EAE-Klinik analog zu einem sekundär chronisch progredienten Verlaufstyp bzw. zu einer primär progredienten Verlaufsform der Multiplen Sklerose führen. Mechanistische Implikationen des TIMP-3 im EAE-Modell stellt die *Abbildung 25* vor.

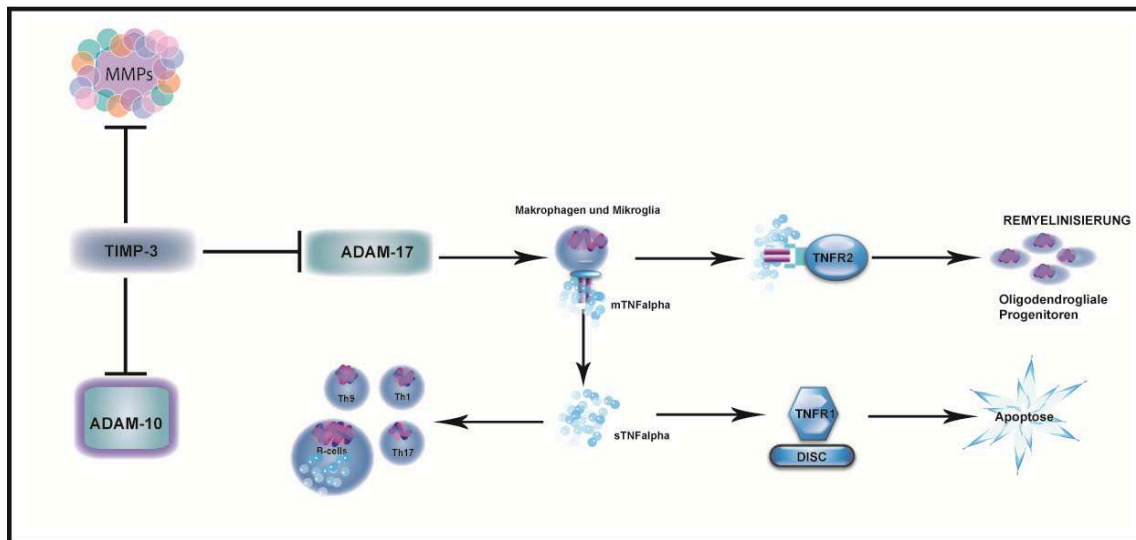


Abb. 25: Die Darstellung zeigt TIMP-3-Funktionen mit pathomechanistischen Implikationen auf den EAE-Verlauf an. Das Fehlen von TIMP-3 führt zu ADAM-17-vermittelter Hyperaktivierung des proapoptotisch sTNF/TNFR1-Signalweges und parallel zur Hypoaktivierung des protektiven mTNF/TNRF2-Signalweges. TNF: Tumornekrosefaktor, TNFR: TNF-Rezeptor, DISC: Death Inducing Signal Complex

5.6 Klinische Perspektiven und Weiterführung des Projektes

Diese Arbeit lässt den Schluss zu, dass TIMP-3 anscheinend eine bedeutende Rolle bei der effizienten Remyelinisierung und Remission der EAE-Klinik spielt. Sowohl die aktiv als auch die passiv induzierte EAE wiesen eine eingeschränkte Remission der EAE-Symptomatik bei TIMP-3^{-/-}-Mäusen auf, wobei die akute Phase der EAE eine vergleichbare Klinikentwicklung in der defizienten und in der Wildtyp-Linie zeigte. Es wird immer häufiger postuliert, dass bestimmte MS-Formen einen neurodegenerativen Charakter aufweisen können. Somit bleibt die Generierung eines adäquaten Tiermodells, das neurodegenerative Mechanismen der MS imitieren könnte, im Fokus des Interesses.

Die MS-Subtypen mit primärer Oligodendrozytendystrophie zeichnet außerdem ein fehlendes Ansprechen auf eine immunmodulatorische Therapie mit Interferon-β aus, was eine nicht nur immunologische Pathogenese impliziert.

Trotz des gut etablierten EAE-Modells für die immunpathologischen Subtypen I und II der MS ist bis dato kein experimentelles Tiermodell für eine primäre Oligodendrozytendystrophie, entsprechend den Subtypen III und IV nach Lucchinetti, bekannt. Da in unserem Projekt die TIMP-3^{-/-}-Tiere analog zu der primär progredienten Form der MS keine Remission der Klinik zeigten, erscheint dieses Tiermodell in dieser Hinsicht interessant zu sein.

Um diese attraktive Hypothese zu evaluieren und um einen ausgeschalteten apoptotischen Signalweg in diesem Modell nachweisen zu können, müssen zunächst einige wichtige Punkte zum Mechanismus geklärt werden. Zum einen ist eine Ausschaltung des TNFR1 vonnöten, um eine effiziente Remyelinisierung und Remission der Klinik bei TIMP-3^{-/-}-Maus möglicherweise wiederherstellen zu können, was mechanistisch einen oligodendroglialen Untergang auf dem apoptotischen Signalweg bestätigen würde. Diese Ausschaltung ist entweder mit einem monoklonalen gegen den Rezeptor TNFR1 gerichteten Antikörper bzw. mit einer Kreuzung der TNFR-1^{-/-}-Maus mit der TIMP-3^{-/-}-Maus zu bewerkstelligen. Diese Maßnahmen könnten den zur apoptotischen Kaskade führenden Signalweg inhibieren. Demzufolge könnte möglicherweise bei TIMP-3^{-/-}-Mäusen eine effizientere Remyelinisierung stattfinden, da die apoptotische Kaskade nicht initiiert wird.

Andererseits ist auch der TNFR2-Signalweg im EAE-Tiermodell interessant, da er möglicherweise als der zweite Arm der dualen TNF-Wirkung bei demyelinisierenden Prozessen eine antagonistische Funktion aufweist. Es wird nämlich postuliert, dass eine überexprimierte membranöse TNF-Form oligodendrogliale differenzierte Progenitoren zur Proliferation stimuliert. Dieser Pathomechanismus der dualen Wirkung von TNF steht bereits seit mehreren Jahren im Fokus des Interesses vieler Arbeitsgruppen. Analog zum dritten Newtonschen Gesetz gibt es keine Reaktion ohne vorausgegangene Aktion. Auf Myelinscheiden-Ebene würde dies bedeuten, dass keine Remyelinisierung ohne vorausgegangene Demyelinisierung initiiert wird.

Künftige Untersuchungen sollen sich auch auf andere Substanzen, z.B. Interleukine, fokussieren, die TACE- vermittelte Signalwege regulieren können. Die Ergebnisse dieser Arbeiten könnten möglicherweise neue den klinischen Verlauf modifizierende Therapieansätze für die MS ergeben. Interessant erscheinen auch die klinisch asymptomatisch verlaufenden demyelinisierenden Prozesse im ZNS. Hier stellt sich die

Frage, ob sich bei diesen Fällen durch eine effiziente Remyelinisierung keine fokale neurologische Symptomatik zeigt.

In Kenntnis dieser Daten erscheint auch die Frage interessant, ob eine TIMP-3-Überexpression zu einer effizienteren Remyelinisierung mit konsekutiver effizienterer Rückbildung der EAE-Symptomatik führen würde.

In der Zusammenschau ist zu konstatieren, dass sich mit einem besseren Verständnis der Komplexität des TNF-Signalweges neue therapeutische Ansätze für die Behandlung von MS-Patienten ergeben könnten, obgleich die ersten klinischen Studien mit nichtselektiven antiTNF-Antikörpern zu einer Progredienz der MS führten (Caminero et al., 2011; van Oosten et al., 1996).

6. Literaturverzeichnis

Arnett, H.A., Mason, J., Marino, M., Suzuki, K., Matsushima, G.K., and Ting, J.P. (2001). TNF alpha promotes proliferation of oligodendrocyte progenitors and remyelination. *Nat Neurosci* 4, 1116-1122.

Baarine, M., Ragot, K., Genin, E., Hajj, H., Trompier, D., Andreoletti, P., Ghandour, S., Menetrier, F., Cherkaoui-Malki, M., Savary, S., *et al.* (2009). Peroxisomal and Mitochondrial Status of Two Murine Oligodendrocytic Cell Lines (158N, 158JP): Potential Models for the Study of Peroxisomal Disorders Associated with Dysmyelination Processes. *J Neurochem*.

Baba, Y., Yasuda, O., Takemura, Y., Ishikawa, Y., Ohishi, M., Iwanami, J., Mogi, M., Doe, N., Horiuchi, M., Maeda, N., *et al.* (2009a). Timp-3 deficiency impairs cognitive function in mice. *Lab Invest*.

Baba, Y., Yasuda, O., Takemura, Y., Ishikawa, Y., Ohishi, M., Iwanami, J., Mogi, M., Doe, N., Horiuchi, M., Maeda, N., *et al.* (2009b). Timp-3 deficiency impairs cognitive function in mice. In *Lab Invest (United States)*, pp. 1340-1347.

Brambilla, R., Ashbaugh, J.J., Magliozzi, R., Dellarole, A., Karmally, S., Szymkowski, D.E., and Bethea, J.R. (2011). Inhibition of soluble tumour necrosis factor is therapeutic in experimental autoimmune encephalomyelitis and promotes axon preservation and remyelination. *Brain* 134, 2736-2754.

Bramow, S., Frischer, J.M., Lassmann, H., Koch-Henriksen, N., Lucchinetti, C.F., Sorensen, P.S., and Laursen, H. (2010). Demyelination versus remyelination in progressive multiple sclerosis. *Brain* 133, 2983-2998.

Brew, K., and Nagase, H. (2010). The tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs): an ancient family with structural and functional diversity. In *Biochim Biophys Acta (Netherlands: 2010 Elsevier B.V)*, pp. 55-71.

Caminero, A., Comabella, M., and Montalban, X. (2011). Tumor necrosis factor alpha (TNF-alpha), anti-TNF-alpha and demyelination revisited: an ongoing story. *J Neuroimmunol* 234, 1-6.

Candelario-Jalil, E., Yang, Y., and Rosenberg, G.A. (2009). Diverse roles of matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases in neuroinflammation and cerebral ischemia. *Neuroscience* 158, 983-994.

Carswell, E.A., Old, L.J., Kassel, R.L., Green, S., Fiore, N., and Williamson, B. (1975). An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 72, 3666-3670.

Chandler, S., Coates, R., Gearing, A., Lury, J., Wells, G., and Bone, E. (1995). Matrix metalloproteinases degrade myelin basic protein. *Neurosci Lett* 201, 223-226.

Compston, A., and Coles, A. (2002). Multiple sclerosis. In *Lancet* (England), pp. 1221-1231.

Crocker, S.J., Pagenstecher, A., and Campbell, I.L. (2004). The TIMPs tango with MMPs and more in the central nervous system. *J Neurosci Res* 75, 1-11.

Crocker, S.J., Whitmire, J.K., Frausto, R.F., Chertboonmuang, P., Soloway, P.D., Whitton, J.L., and Campbell, I.L. (2006). Persistent macrophage/microglial activation and myelin disruption after experimental autoimmune encephalomyelitis in tissue inhibitor of metalloproteinase-1-deficient mice. *Am J Pathol* 169, 2104-2116.

Cruz-Munoz, W., Kim, I., and Khokha, R. (2006a). TIMP-3 deficiency in the host, but not in the tumor, enhances tumor growth and angiogenesis. In *Oncogene* (England), pp. 650-655.

Cruz-Munoz, W., Sanchez, O.H., Di Grappa, M., English, J.L., Hill, R.P., and Khokha, R. (2006b). Enhanced metastatic dissemination to multiple organs by melanoma and lymphoma cells in *timp-3*^{-/-} mice. In *Oncogene* (England), pp. 6489-6496.

Dawson, M.R., Levine, J.M., and Reynolds, R. (2000). NG2-expressing cells in the central nervous system: are they oligodendroglial progenitors? *J Neurosci Res* 61, 471-479.

de Rosbo, N.K., and Ben-Nun, A. (1998). T-cell responses to myelin antigens in multiple sclerosis; relevance of the predominant autoimmune reactivity to myelin oligodendrocyte glycoprotein. In *J Autoimmun* (England: 1998 Academic Press), pp. 287-299.

Duffy, M.J., Lynn, D.J., Lloyd, A.T., and O'Shea, C.M. (2003). The ADAMs family of proteins: from basic studies to potential clinical applications. In *Thromb Haemost* (Germany), pp. 622-631.

Fata, J.E., Leco, K.J., Voura, E.B., Yu, H.Y., Waterhouse, P., Murphy, G., Moorehead, R.A., and Khokha, R. (2001). Accelerated apoptosis in the Timp-3-deficient mammary gland. *J Clin Invest* 108, 831-841.

Fedak, P.W., Smookler, D.S., Kassiri, Z., Ohno, N., Leco, K.J., Verma, S., Mickle, D.A., Watson, K.L., Hojilla, C.V., Cruz, W., *et al.* (2004). TIMP-3 deficiency leads to dilated cardiomyopathy. *Circulation* 110, 2401-2409.

Franciotta, D., Salvetti, M., Lolli, F., Serafini, B., and Aloisi, F. (2008). B cells and multiple sclerosis. In *Lancet Neurol* (England), pp. 852-858.

Fujinami, R.S., and Oldstone, M.B. (1985). Amino acid homology between the encephalitogenic site of myelin basic protein and virus: mechanism for autoimmunity. *Science* 230, 1043-1045.

Gijbels, K., Galardy, R.E., and Steinman, L. (1994). Reversal of experimental autoimmune encephalomyelitis with a hydroxamate inhibitor of matrix metalloproteases. *J Clin Invest* 94, 2177-2182.

Gijbels, K., Masure, S., Carton, H., and Opdenakker, G. (1992). Gelatinase in the cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis and other inflammatory neurological disorders. *J Neuroimmunol* 41, 29-34.

Gijbels, K., Proost, P., Masure, S., Carton, H., Billiau, A., and Opdenakker, G. (1993). Gelatinase B is present in the cerebrospinal fluid during experimental autoimmune encephalomyelitis and cleaves myelin basic protein. *J Neurosci Res* 36, 432-440.

Gill, S.E., Huizar, I., Bench, E.M., Sussman, S.W., Wang, Y., Khokha, R., and Parks, W.C. (2010). Tissue inhibitor of metalloproteinases 3 regulates resolution of inflammation following acute lung injury. In *Am J Pathol* (United States), pp. 64-73.

Gill, S.E., Pape, M.C., and Leco, K.J. (2009). Absence of tissue inhibitor of metalloproteinases 3 disrupts alveologenesis in the mouse. In *Dev Growth Differ* (Japan), pp. 17-24.

Gurney, K.J., Estrada, E.Y., and Rosenberg, G.A. (2006). Blood-brain barrier disruption by stromelysin-1 facilitates neutrophil infiltration in neuroinflammation. *Neurobiol Dis* 23, 87-96.

Hein, T., and Hopfenmuller, W. (2000). [Projection of the number of multiple sclerosis patients in Germany]. *Nervenarzt* 71, 288-294.

Hoe, H.S., Cooper, M.J., Burns, M.P., Lewis, P.A., van der Brug, M., Chakraborty, G., Cartagena, C.M., Pak, D.T., Cookson, M.R., and Rebeck, G.W. (2007). The metalloprotease inhibitor TIMP-3 regulates amyloid precursor protein and apolipoprotein E receptor proteolysis. In *J Neurosci (United States)*, pp. 10895-10905.

Hoe, H.S., and Rebeck, G.W. (2008). Regulated proteolysis of APP and ApoE receptors. *Mol Neurobiol* 37, 64-72.

Horner, P.J., Power, A.E., Kempermann, G., Kuhn, H.G., Palmer, T.D., Winkler, J., Thal, L.J., and Gage, F.H. (2000). Proliferation and differentiation of progenitor cells throughout the intact adult rat spinal cord. *J Neurosci* 20, 2218-2228.

Janssen, A., Hoellenriegel, J., Fogarasi, M., Schrewe, H., Seeliger, M., Tamm, E., Ohlmann, A., May, C.A., Weber, B.H., and Stohr, H. (2008). Abnormal vessel formation in the choroid of mice lacking tissue inhibitor of metalloprotease-3. In *Invest Ophthalmol Vis Sci (United States)*, pp. 2812-2822.

Jurewicz, A., Matysiak, M., Tybor, K., Kilianek, L., Raine, C.S., and Selmaj, K. (2005). Tumour necrosis factor-induced death of adult human oligodendrocytes is mediated by apoptosis inducing factor. *Brain* 128, 2675-2688.

Kuhlmann, T., Goldschmidt, T., Antel, J., Wegner, C., Konig, F., Metz, I., and Bruck, W. (2009). Gender differences in the histopathology of MS? *J Neurol Sci*.

Larsen, P.H., Wells, J.E., Stallcup, W.B., Opdenakker, G., and Yong, V.W. (2003). Matrix metalloproteinase-9 facilitates remyelination in part by processing the inhibitory NG2 proteoglycan. *J Neurosci* 23, 11127-11135.

Lassmann, H., Bruck, W., and Lucchinetti, C.F. (2007). The immunopathology of multiple sclerosis: an overview. In *Brain Pathol (Switzerland)*, pp. 210-218.

- Lebar, R., Lubetzki, C., Vincent, C., Lombrail, P., and Boutry, J.M. (1986). The M2 autoantigen of central nervous system myelin, a glycoprotein present in oligodendrocyte membrane. *Clin Exp Immunol* 66, 423-434.
- Leco, K.J., Khokha, R., Pavloff, N., Hawkes, S.P., and Edwards, D.R. (1994). Tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3) is an extracellular matrix-associated protein with a distinctive pattern of expression in mouse cells and tissues. *J Biol Chem* 269, 9352-9360.
- Leco, K.J., Waterhouse, P., Sanchez, O.H., Gowing, K.L., Poole, A.R., Wakeham, A., Mak, T.W., and Khokha, R. (2001). Spontaneous air space enlargement in the lungs of mice lacking tissue inhibitor of metalloproteinases-3 (TIMP-3). *J Clin Invest* 108, 817-829.
- Lehmann, P.V., Forsthuber, T., Miller, A., and Sercarz, E.E. (1992). Spreading of T-cell autoimmunity to cryptic determinants of an autoantigen. *Nature* 358, 155-157.
- Liu, W., Furuichi, T., Miyake, M., Rosenberg, G.A., and Liu, K.J. (2007). Differential expression of tissue inhibitor of metalloproteinases-3 in cultured astrocytes and neurons regulates the activation of matrix metalloproteinase-2. *J Neurosci Res* 85, 829-836.
- Lucchinetti, C. (2008). Pathological heterogeneity of idiopathic central nervous system inflammatory demyelinating disorders. *Curr Top Microbiol Immunol* 318, 19-43.
- Lucchinetti, C., Bruck, W., Parisi, J., Scheithauer, B., Rodriguez, M., and Lassmann, H. (2000). Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol* 47, 707-717.
- Lucchinetti, C.F., Bruck, W., and Lassmann, H. (2004). Evidence for pathogenic heterogeneity in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 56, 308.
- Macgregor, A.M., Eberhart, C.G., Fraig, M., Lu, J., and Halushka, M.K. (2009). Tissue inhibitor of matrix metalloproteinase-3 levels in the extracellular matrix of lung, kidney, and eye increase with age. *J Histochem Cytochem* 57, 207-213.
- Maeda, Y., Solanky, M., Menonna, J., Chapin, J., Li, W., and Dowling, P. (2001). Platelet-derived growth factor-alpha receptor-positive oligodendroglia are. *Ann Neurol* 49, 776-785.

Mason, J.L., Xuan, S., Dragatsis, I., Efstratiadis, A., and Goldman, J.E. (2003). Insulin-like growth factor (IGF) signaling through type 1 IGF receptor plays an important role in remyelination. *J Neurosci* 23, 7710-7718.

McCoy, M.K., and Tansey, M.G. (2008). TNF signaling inhibition in the CNS: implications for normal brain function and neurodegenerative disease. *J Neuroinflammation* 5, 45.

Mendel, I., Kerlero de Rosbo, N., and Ben-Nun, A. (1995). A myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide induces typical chronic experimental autoimmune encephalomyelitis in H-2b mice: fine specificity and T cell receptor V beta expression of encephalitogenic T cells. *Eur J Immunol* 25, 1951-1959.

Menghini, R., Menini, S., Amoroso, R., Fiorentino, L., Casagrande, V., Marzano, V., Tornei, F., Bertucci, P., Iacobini, C., Serino, M., *et al.* (2009). Tissue inhibitor of metalloproteinase 3 deficiency causes hepatic steatosis and adipose tissue inflammation in mice. In *Gastroenterology (United States)*, pp. 663-672 e664.

Mohammed, F.F., Smookler, D.S., Taylor, S.E., Fingleton, B., Kassiri, Z., Sanchez, O.H., English, J.L., Matrisian, L.M., Au, B., Yeh, W.C., *et al.* (2004). Abnormal TNF activity in Timp3^{-/-} mice leads to chronic hepatic inflammation and failure of liver regeneration. In *Nat Genet (United States)*, pp. 969-977.

Mun-Bryce, S., and Rosenberg, G.A. (1998). Gelatinase B modulates selective opening of the blood-brain barrier during inflammation. *Am J Physiol* 274, R1203-1211.

Murphy, G., and Nagase, H. (2008). Progress in matrix metalloproteinase research. In *Mol Aspects Med (England)*, pp. 290-308.

Nagase, H., Visse, R., and Murphy, G. (2006). Structure and function of matrix metalloproteinases and TIMPs. *Cardiovasc Res* 69, 562-573.

Nagase, H., and Woessner, J.F., Jr. (1999). Matrix metalloproteinases. *J Biol Chem* 274, 21491-21494.

Nomura, T., Abe, Y., Kamada, H., Shibata, H., Kayamuro, H., Inoue, M., Kawara, T., Arita, S., Furuya, T., Yamashita, T., *et al.* (2011). Therapeutic effect of PEGylated

TNFR1-selective antagonistic mutant TNF in experimental autoimmune encephalomyelitis mice. *J Control Release* 149, 8-14.

Olson, J.K., Croxford, J.L., Calenoff, M.A., Dal Canto, M.C., and Miller, S.D. (2001). A virus-induced molecular mimicry model of multiple sclerosis. *J Clin Invest* 108, 311-318.

Pagenstecher, A., Stalder, A.K., Kincaid, C.L., Shapiro, S.D., and Campbell, I.L. (1998). Differential expression of matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase genes in the mouse central nervous system in normal and inflammatory states. *Am J Pathol* 152, 729-741.

Paterson, P.Y. (1960). Transfer of allergic encephalomyelitis in rats by means of lymph node cells. *J Exp Med* 111, 119-136.

Patrikios, P., Stadelmann, C., Kutzelnigg, A., Rauschka, H., Schmidbauer, M., Laursen, H., Sorensen, P.S., Bruck, W., Lucchinetti, C., and Lassmann, H. (2006). Remyelination is extensive in a subset of multiple sclerosis patients. *Brain* 129, 3165-3172.

Plumb, J., Cross, A.K., Surr, J., Haddock, G., Smith, T., Bunning, R.A., and Woodroffe, M.N. (2005). ADAM-17 and TIMP3 protein and mRNA expression in spinal cord white matter of rats with acute experimental autoimmune encephalomyelitis. In *J Neuroimmunol* (Netherlands), pp. 1-9.

Polito, A., and Reynolds, R. (2005). NG2-expressing cells as oligodendrocyte progenitors in the normal and demyelinated adult central nervous system. *J Anat* 207, 707-716.

Rasmussen, S., Imitola, J., Ayuso-Sacido, A., Wang, Y., Starossom, S.C., Kivisakk, P., Zhu, B., Meyer, M., Bronson, R.T., Garcia-Verdugo, J.M., *et al.* (2011). Reversible neural stem cell niche dysfunction in a model of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 69, 878-891.

Reiss, K., and Saftig, P. (2009). The "a disintegrin and metalloprotease" (ADAM) family of sheddases: physiological and cellular functions. In *Semin Cell Dev Biol* (England), pp. 126-137.

Rose-John, S., Scheller, J., Elson, G., and Jones, S.A. (2006). Interleukin-6 biology is coordinated by membrane-bound and soluble receptors: role in inflammation and cancer. *J Leukoc Biol* 80, 227-236.

Rosenberg, G.A. (2009). Matrix metalloproteinases and their multiple roles in neurodegenerative diseases. In *Lancet Neurol* (England), pp. 205-216.

Saftig, P., and Reiss, K. (2010). The "A Disintegrin And Metalloproteases" ADAM10 and ADAM17: Novel drug targets with therapeutic potential? In *Eur J Cell Biol* (A 2010 Elsevier GmbH).

Sahebjam, S., Khokha, R., and Mort, J.S. (2007). Increased collagen and aggrecan degradation with age in the joints of Timp3(-/-) mice. *Arthritis Rheum* 56, 905-909.

Scolding, N., Franklin, R., Stevens, S., Heldin, C.H., Compston, A., and Newcombe, J. (1998). Oligodendrocyte progenitors are present in the normal adult human CNS and in the lesions of multiple sclerosis. *Brain* 121 (Pt 12), 2221-2228.

Selmaj, K., Raine, C.S., Cannella, B., and Brosnan, C.F. (1991a). Identification of lymphotoxin and tumor necrosis factor in multiple sclerosis lesions. *J Clin Invest* 87, 949-954.

Selmaj, K., Raine, C.S., Farooq, M., Norton, W.T., and Brosnan, C.F. (1991b). Cytokine cytotoxicity against oligodendrocytes. Apoptosis induced by lymphotoxin. *J Immunol* 147, 1522-1529.

Smookler, D.S., Mohammed, F.F., Kassiri, Z., Duncan, G.S., Mak, T.W., and Khokha, R. (2006). Tissue inhibitor of metalloproteinase 3 regulates TNF-dependent systemic inflammation. In *J Immunol* (United States), pp. 721-725.

Spach, K.M., and Hayes, C.E. (2005). Vitamin D3 confers protection from autoimmune encephalomyelitis only in female mice. In *J Immunol* (United States), pp. 4119-4126.

Stadelmann, C. (2011). Multiple sclerosis as a neurodegenerative disease: pathology, mechanisms and therapeutic implications. *Curr Opin Neurol*.

Stadelmann, C., Wegner, C., and Bruck, W. (2011). Inflammation, demyelination, and degeneration - recent insights from MS pathology. In *Biochim Biophys Acta* (Netherlands: 2010 Elsevier B.V), pp. 275-282.

Stone, A.L., Kroeger, M., and Sang, Q.X. (1999). Structure-function analysis of the ADAM family of disintegrin-like and metalloproteinase-containing proteins (review). *J Protein Chem* 18, 447-465.

Taoufik, E., Tseveleki, V., Chu, S.Y., Tselios, T., Karin, M., Lassmann, H., Szymkowski, D.E., and Probert, L. (2011). Transmembrane tumour necrosis factor is neuroprotective and regulates experimental autoimmune encephalomyelitis via neuronal nuclear factor-kappaB. *Brain* 134, 2722-2735.

Teuscher, C., Bunn, J.Y., Fillmore, P.D., Butterfield, R.J., Zachary, J.F., and Blankenhorn, E.P. (2004). Gender, age, and season at immunization uniquely influence the genetic control of susceptibility to histopathological lesions and clinical signs of experimental allergic encephalomyelitis: implications for the genetics of multiple sclerosis. *Am J Pathol* 165, 1593-1602.

Thorne, M., Moore, C.S., and Robertson, G.S. (2009). Lack of TIMP-1 increases severity of experimental autoimmune encephalomyelitis: Effects of darbepoetin alfa on TIMP-1 null and wild-type mice. In *J Neuroimmunol* (Netherlands), pp. 92-100.

Tousseyn, T., Jorissen, E., Reiss, K., and Hartmann, D. (2006). (Make) stick and cut loose--disintegrin metalloproteases in development and disease. *Birth Defects Res C Embryo Today* 78, 24-46.

van Oosten, B.W., Barkhof, F., Truyen, L., Boringa, J.B., Bertelsmann, F.W., von Blomberg, B.M., Woody, J.N., Hartung, H.P., and Polman, C.H. (1996). Increased MRI activity and immune activation in two multiple sclerosis patients treated with the monoclonal anti-tumor necrosis factor antibody cA2. *Neurology* 47, 1531-1534.

Vana, A.C., Flint, N.C., Harwood, N.E., Le, T.Q., Fruttiger, M., and Armstrong, R.C. (2007). Platelet-derived growth factor promotes repair of chronically demyelinated white matter. *J Neuropathol Exp Neurol* 66, 975-988.

Visse, R., and Nagase, H. (2003). Matrix metalloproteinases and tissue inhibitors of metalloproteinases: structure, function, and biochemistry. In *Circ Res (United States)*, pp. 827-839.

Walker, E.J., and Rosenberg, G.A. (2009). TIMP-3 and MMP-3 contribute to delayed inflammation and hippocampal neuronal death following global ischemia. *Exp Neurol* 216, 122-131.

Zhou, Y.X., Flint, N.C., Murtie, J.C., Le, T.Q., and Armstrong, R.C. (2006). Retroviral lineage analysis of fibroblast growth factor receptor signaling in FGF2 inhibition of oligodendrocyte progenitor differentiation. *Glia* 54, 578-590.

7. Abkürzungsverzeichnis

ABC Avidin-Biotin-Peroxidase-Komplex

ADAM A Disintegrin and Metalloproteinase

APC Antigene presenting cell (Antigen präsentierende Zelle)

APP Amyloid Precursor Protein

CPM counts per minute (Zählrate)

°C Grad Celsius

DAB Diaminobenzidin-Tetrahydrochlorid

DDSA Dodecenylbernsteinsäureanhydrid

DNA desoxynucleic acid (Desoxyribonukleinsäure)

dNTP 2'-deoxynucleoside 5'-triphosphate

DPM decays per minute (Zerfälle pro Minute)

EAE experimentelle allergische Enzephalomyelitis

ELISA enzyme linked immunosorbent assay

FACS fluorescence activated cell sorter (Durchflusszytometrie)

HE Hämatoxylin-Eosin

IFN- α Interferon Alpha

IFN- γ Interferon Gamma

IHC Immunhistochemie

i.p. intraperitoneal

kb Kilobasen

kDa Kilo-Dalton

KO Knock out (molekularbiologisch ausgeschaltetes Gen)

KG Körpergewicht

M Molar

m milli

μ mikro

mg Milligramm

MMP Matrix-Metalloproteinase

MNA Methylnorbonen-2,3-dicarbonsäurehydrid

MOG Meylin-Oligodendrozyten-Glykoprotein

MS Multiple Sklerose

mRNA messenger ribonucleic acid (Boten-Ribonukleinsäure)

PBS phosphate buffered saline (phosphatgepufferte Salzlösung)

PCR polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)

RNA ribonucleic acid (Ribonukleinsäure)

RPA RNase protection assay

rpm rounds per Minute (Umdrehungen pro Minute)

RT Raumtemperatur

SDS Sodiumdodecylsulfat

TACE TNF Converting Enzyme

TEMED Tetramethylethylendiamin

TIMP Tissue Inhibitor of Matrix Metalloproteinases

Th T-Helferzellen

TNF Tumor Necrosis Factor

WD working dilution (RPA-Sonde mit Hybridisierungspuffer)

WT Wildtyp

ZNS Zentralnervensystem

8. Lebenslauf

Personalien:

Bartosz Bujan, geb. am 28.07.1978 in Częstochowa (Polen)

Familienstand: verheiratet

Staatsangehörigkeit: polnisch und deutsch

Schul Ausbildung:

- 1985-1993 Adam Mickiewicz Grundschule in Oppeln
- 1993-1997 Marie Skłodowska Curie Gymnasium in Oppeln

Studium der Humanmedizin:

- 1997-2003 Studium der Humanmedizin an der Medizinischen Universität Lodsch (Polen)

Klinische Tätigkeit:

- 2003-2004 Arzt im Praktikum , Universitätsklinikum Warschau
- 2005- Erteilung der Approbation, Bezirksregierung Arnsberg
- 2005-2006 Assistenzarzt in der Neurologischen Fachklinik Hilchenbach
- 2006-2008 Assistenzarzt in der Neurologischen Klinik des Klinikums Hanau (Akademisches Lehrkrankenhaus der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main)
- 2008-2009 Assistenzarzt im Zentrum für Soziale Psychiatrie Köppern
- 2009-2012 wissenschaftlicher Mitarbeiter der Neuropathologischen Abteilung des Universitätsklinikums in Marburg, Philipps Universität Marburg (Diagnostik, Lehre und Forschung)
- 2010 Facharzt für Neurologie, Bezirksärztekammer Frankfurt am Main
- Seit dem 01.02.2012 Oberarzt der Fachklinik für Neurologie und Klinische Neuropsychologie, Neuroorthopädisches Zentrum in Bad Orb

Wissenschaftliche Tätigkeit:

- 01.2010 Beginn der experimentellen Doktorarbeit mit dem Thema: „Einfluss von TIMP-3 auf den Verlauf der experimentellen allergischen Enzephalomyelitis“
- “Multiple system atrophy of the cerebellar type (MSA-C) with concomitant beta-amyloid and tau pathology“, Clin Neuropathol. 2013 Jan 15
- „Mast cells as diagnostic criterion in angiomatous meningioma“
Posterdarstellung am Kongress der Deutschen Gesellschaft für Neuropathologie und Neuroanatomie, Tübingen 21-24 September 2011

9. Verzeichnis der akademischen Lehrer

Meine akademischen Lehrer waren:

in Lodsch (Polen) Prof. Dr. med. H. Chmielewski

Dr. med. B. Zientarski

in Hanau Priv.-Doz. Dr. med. H. Baas

in Köppern Prof. Dr. med. G. Schiller

in Marburg Prof. Dr. med. H.-D. Mennel

Prof. Dr. med. A. Pagenstecher

10. Danksagung

Ich wollte herzlichen Dank zunächst meinem Doktorvater, Professor Pagenstecher aussprechen, der mir die Fertigstellung meiner Doktorarbeit ermöglichte. Sie haben mich, Herr Professor Pagenstecher, nicht nur binnen der gesamten Laborarbeit betreut und fachlich unterstützt, sondern auch an mich immer geglaubt. Ich danke für unsere anregenden Diskussionen sowie für die konstruktive Kritik, die ich sehr geschätzt habe. Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn Dr. Hofer sowie dem gesamten Team der Abteilung für Neuropathologie, Uniklinik Marburg. Ich konnte immer mit einem guten Rat, einer methodischen Unterstützung sowie einer Hilfsbereitschaft rechnen. Besten Dank möchte ich für die statistische Auswertung an Frau Dr. Timmesfeld, Institut für Medizinische Biometrie und Epidemiologie der Universität Marburg richten.

Anschließend möchte ich mich ganz herzlich bei meiner Frau und meinen zwei Töchtern Natalie und Nadja bedanken, dass ihr mich stets unterstützt habt.

